Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

**“Desenvolvimento de nanopartículas protéicas polimerizadas para
veiculação de fotoativos aplicáveis ao tratamento de câncer do sistema
nervoso central”.**

Nathalia Nossi Davanzo

Dissertação apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade
de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do
título de Mestre em Ciências, Área: **Química**

RIBEIRÃO PRETO -SP

2016

Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

**“Desenvolvimento de nanopartículas protéicas polimerizadas para
veiculação de fotoativos aplicáveis ao tratamento de câncer do sistema
nervoso central”.**

Nathalia Nossi Davanzo

Dissertação apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade
de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do
título de Mestre em Ciências, Área: **Química**
Orientador: Prof. Dr. Antonio Claudio Tedesco

RIBEIRÃO PRETO -SP

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Davanzo, Nathalia Nossi

Desenvolvimento de nanopartículas protéicas polimerizadas para veiculação de fotoativos aplicáveis ao tratamento de câncer do sistema nervoso central, Ribeirão Preto, 2016.

p.91 : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Química.

Orientador: Tedesco, Antonio Claudio.

1. Terapia Fotodinâmica. 2. Nanopartícula de Albumina. 3. Ftalocianina de cloro alumínio. 4. Curcumina.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Antonio Claudio Tedesco pela confiança, orientação, aprendizado e pela oportunidade de desenvolver essa pesquisa.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Fernando Lucas Primo que sempre me orientou, dando conselhos durante o desenvolvimento do trabalho.

Aos meus pais, Maria Vanilde e Irineu, por seu amor incondicional, que sempre me deram força, apoiaram e participaram de mais essa etapa da minha vida. Obrigada por acreditarem em mim, sem vocês nada disso teria sido possível. Eu amo muito vocês.

Ao meu irmão, Igor, que me acompanhou durante essa jornada, me agüentou nos momentos de estresse, sendo uma ótima companhia.

Ao meu namorado e melhor amigo, Luiz Américo pela amizade, carinho, incentivo, compreensão, pelos momentos de atenção e descontração, e por me alegrar em momentos ruins.

Aos amigos do Laboratório de Fotobiologia e Fotomedicina, pela amizade, e por tornarem o dia-a-dia mais alegre e descontraído. As minhas queridas amigas Mary, Gra, Jaque, e TÁCILA pela amizade e por sempre estarem dispostas a ajudar. A Paty que sempre me ajudou muito, e que mesmo longe considero uma grande amiga, e que com certeza fará muita falta. A Olimpia, por sua dedicação, disposição e por sempre ter um tempo para “quebrar o galho” dos alunos.

À todos que acreditaram e torceram por mim.

À Universidade de São Paulo e aos docentes e funcionários da FFCLRP-USP.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Resumo

Davanzo, N.N. **Desenvolvimento de nanopartículas protéicas polimerizadas para veiculação de fotoativos aplicáveis ao tratamento de câncer do sistema nervoso central.** 2016.91f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Glioblastoma multiforme (GBM) é o tipo mais comum e agressivo de tumor cerebral em adultos. O tempo de vida do paciente diagnosticado com GBM é, em média, 14 meses, apesar dos tratamentos convencionais, como a radioterapia, neurocirurgia e quimioterapia. A terapia fotodinâmica (TFD), juntamente com a nanotecnologia, são tratamentos alternativos e promissores para o combate do câncer do sistema nervoso central. Sendo assim, foi desenvolvido e avaliado nanopartículas de soro albumina humano (PAM), para veiculação controlada de fotoativos (AlClPc e curcumina) aplicáveis no tratamento fotodinâmico do câncer do sistema nervoso central. As nanopartículas de albumina foram preparadas por dois métodos distintos (*crosslinking* químico e térmico), e para avaliar qual formulação apresentou as características desejáveis foram feitas caracterizações físico-químicas como tamanho médio de partícula, índice de polidispersividade, potencial zeta e taxa de associação dos fármacos fotossensibilizadores incorporados. A formulação preparada pelo *crosslinking* químico (PAMQ) exibiu características físico-químicas satisfatórias para os estudos *in vitro*, obtendo tamanho médio de partículas de 250 nm, distribuição homogênea ($PDI < 0,3$), potencial zeta negativo (-25 mV), e quantidades de ativos incorporados na nanopartícula de albumina foi de aproximadamente 20% para a AlClPc e 40% para a curcumina. A análise morfológica foi realizada através de microscopia de força atômica (MFA), pela qual se observou o formato esférico, e composição heterogênea das nanopartículas. A formulação apresentou estabilidade com previsão de *shelf life* de aproximadamente 9 meses. A PAMQ apresentou ainda biocompatibilidade *in vitro*, na ausência de ativação fotodinâmica, frente à linhagem celular de glioblastoma humano, pelos ensaios de MTT (atividade mitocondrial *in vitro*). Sob irradiação de luz visível em 675 nm em uma dose máxima de 700 mJ.cm^{-2} , o efeito fototóxico provocado pela PAMQAlClPc (3 μM) reduziu a viabilidade celular em 22%, enquanto que sob irradiação de luz visível em 418 nm em uma dose máxima de 2000 mJ.cm^{-2} , o efeito

fototóxico provocado pela PAMQCurcumina (10 μ M) reduziu a viabilidade celular em 59%. Para potencializar o fotodano da célula de glioblastoma humano com a formulação PAMQAlClPc+Curcumina foi feito ensaio em diferentes tempos de irradiação, sendo que no intervalo de 6 horas, a morte celular foi de 77%, provocando um efeito fototóxico desejável para o tratamento fotodinâmico. Portanto, os resultados obtidos neste trabalho indicam que as nanopartículas protéicas apresentam grande potencial para veiculação de fármacos fotossensibilizadores para aplicação da TFD com o propósito do tratamento de câncer do sistema nervoso, incentivando estudos posteriores baseados em ensaios fotobiológicos *in vitro* e *in vivo*.

Palavras chave: glioblastoma, terapia fotodinâmica, nanopartículas de albumina, ftalocianina de cloro alumínio (AlClPc), e curcumina.

Abstract

Davanzo, N.N. **Development of polymerized protein nanoparticles for vehiculation of photoactive applicable to cancer treatment of system central nervous.** 2016.91f. Dissertation (Master). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Glioblastoma multiform (GBM) is the most common and aggressive type of brain tumor in adults. The lifetime of the patient diagnosed with GBM is on average 14 months, despite conventional treatments, such as radiotherapy, neurosurgery, and chemotherapy. Photodynamic therapy (PDT) with nanotechnology is an innovative and promising alternative treatment to combat central nervous system cancer. So, this work proposed to develop albumin nanoparticles (PAM) associated with photosensitizers chloro-aluminiumphthalocyanine (AlClPc) and curcumin for PDT application. Albumin nanoparticles were prepared by two different methods (chemical and thermal *crosslinking*), to evaluate which formulation showed desirable characteristics were performed physicochemical characterizations as mean size, polydispersity index, zeta potential and association rate of photosensitizing drugs incorporated. The formulation prepared by chemical *crosslinking* (PAMQ) exhibited satisfactory physicochemical characteristics for *in vitro* studies, obtaining an average diameter of 250 nm, low distribution (around 0,3), negative zeta potential (about -25 mV) and an active uptake rate around 20% for AlClPc and 40% for curcumin. Morphological analysis was performed using atomic force microscopy (AFM), in which was observed the spherical shape and heterogenic composition of nanoparticles. The formulation shows stability with estimated shelf-life of approximately 9 months. The PAM also demonstrated biocompatibility in the absence of photodynamic activation, using cell lines of human glioblastoma by MTT assays. Under irradiation of visible light of 675 nm the maximum dose of 700 mJ cm⁻², induce phototoxic by PAMQAlClPc (at 3 µM) reduced cell viability to 22%. while under visible light of 418 nm the maximum dose of 2000 mJ cm⁻², showed phototoxic effect caused by PAMQCurcumina (at 10 µM) reduced cell viability to 59%. To potentialize photodamage in human glioblastoma cell with PAMQAlClPc+Curcumin was testing at different times of irradiation, wherein in the range of 6 hours, cell death was 77%, causing a desired phototoxic effect for the photodynamic treatment. Therefore, the results obtained in this study indicate that albumin nanoparticles have great potential to photosensitizing drugs for application of

PDT for the purpose of treatment of cancer of the nervous system, encouraging further studies based in the *in vitro* and *in vivo* photobiologicals assays.

Keywords: Glioblastoma, photodynamic therapy, albumin nanoparticles, aluminum chloride phthalocyanine (AlClPc), and curcumin.

Lista de Figuras

- Figura 1.** Fluxograma representativo das etapas de fotossensibilização e dos mecanismos fotodinâmicos (reações fotodinâmicas do Tipo I e II).....4
- Figura 2.** Diagrama de Jablonski simplificado, ilustrando as transições eletrônicas que dão origem aos mecanismos fotodinâmicos de fotossensibilização molecular. S_0 - Estado fundamental; S_1 - estado singlete excitado; T_1 - estado triplete excitado.....6
- Figura 3.** Estrutura química representativa de alguns fotossensibilizadores: (A) azul de metileno, (B) rosa bengala.....7
- Figura 4.** Estrutura química representativa de uma ftalocianina base livre, sendo M = metal central, R = substituintes axiais.....9
- Figura 5.** Estrutura química representativa ftalocianina de cloro e alumínio (cloro(29H, 31H) ftatocianato de alumínio).....11
- Figura 6 –** Estrutura química da curcumina, (E,E)- 1,7 bis (4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona, utilizado como compostos fotossensibilizador.....11
- Figura 7.** Esquema de preparo da nanopartícula de albumina pelo método da desnaturação por calor (*crosslinking* térmico), obtendo a PAMT encapsulada com AlClPc e a PAMT vazia, respectivamente. Fonte: autores.....19
- Figura 8.** Esquema de preparo das nanocapsulas. Fonte: autores.....20
- Figura 9.** Esquema de preparação das nanopartículas de albumina pelo método do *crosslinking* químico, obtendo as formulações de PAMQ: vazia, AlClPc, Curcumina, e AlClPc+Curcumina, da esquerda para a direita. Fonte: autores.....21
- Figura 10.** Sistema de irradiação laser Nd-YAG acoplado do OPO-rainbow da Quantel Laser, utilizado nos estudos de fotoestimulação.....30
- Figura 11.** Sistema de irradiação com laser Nd-YAG acoplado ao sistema OPO *rainbow* para excitação em 670 nm (A) e sistema laser de diodo modelo *Eagle* com fibra-óptica difusa para excitação em 670 nm (B), ambos utilizados nos estudos de fotoestimulação.....31

Figura 12. Caracterização das formulações em 0, 30, 60, 90: (1) tamanho médio ($\pm$ DP, colunas), (2) índice de polidispersidade ($\pm$ DP, colunas), e (3) potencial zeta ($\pm$ DP, colunas) das formulações de PAMT, vazia e com AlClPc (A), e PAMQ, vazia e com AlClPc (B), respectivamente.....40

Figura 13. Caracterização das formulações em 0, 30, 60, 90, 120 e 150 dias: (A) tamanho médio ($\pm$ DP, colunas), (B) índice de polidispersidade ($\pm$ DP, colunas), e (C) potencial zeta ($\pm$ DP, colunas) das formulações.....42

Figura 14. Fotomicrografias bidimensionais e tridimensionais, respectivamente, obtidas das formulações (A) PAMQVazia, (B) PAMQAlClPc, (C) PAMQCurcumina, e (D) PAMQAlClPc+Curcumina por microscopia de força atômica.....45

Figura 15. Fotomicrografia bidimensional e perfil topográfico dada pela análise do *software* mostrando medições do diâmetro e altura das nanopartículas: (A) Vazia, (B) AlClPc, (C) Curcumina, e (D) AlClPc+Curcumina.....47

Figura 16. Evolução dos perfis de transmissão das formulações (A) PAMVazia, (B)PAMAAlClPc, (C)PAMCurcumina e (D)PAMAAlClPc+Curcumina, centrifugadas a 3000 rpm por 4,4 h, a 25°C. Primeiro registro inferior, último perfis superior direito. A abscissa mostra a posição (nm) e a ordenada à transmissão de luz.....50

Figura 17. Integral da Transmissão na dependência de tempo para as formulações PAMVazia, PAMAAlClPc, PAMCurcumina, PAMAAlClPc+Curcumina, usando LUMiSizer1 a 3000 rpm e 4,4 h.....51

Figura 18. Espectros de absorção UV-Vis (A) e de fluorescência (B), com excitação em 615 nm e máximo de emissão de fluorescência em 674 nm, aberturas de emissão e excitação ajustadas em 3 e 3 nm, respectivamente, de soluções de AlClPc em acetonitrila (concentrações: 0,5 a 3,0ug/mL para absorção e 0,05 a 1,0ug/mL para fluorescência).....52

Figura 19. Curva padrão de AlClPc em acetonitrila: (A) concentração (0,5 – 3 ug/mL) versus absorbância ($y = 0,3492x + 0,0248$; $r = 0,9999$) e (B) concentração (0,05 – 1,0 ug/mL) versus intensidade de fluorescência ($y = 3.10^6 + 386495$; $r = 0,9965$).....53

Figura 20. Espectros de absorção UV-Vis (A) e de fluorescência (B), com excitação em 430 nm, máximo de emissão de fluorescência em 539 nm, e aberturas de emissão e excitação ajustadas em 3 e 3 nm, respectivamente, de soluções de curcumina em acetonitrila (concentrações: 0,2 a 5,0ug/mL para absorção e 0,1 a 2,0ug/mL para fluorescência).....54

Figura 21. Curva padrão de curcumina em acetonitrila: (A) concentração (0,2 – 5,0 ug/mL) versus absorbância ($y = 0,1753x + 0,0049$; $r = 1$) e (B) concentração (0,1 – 1,0 ug/mL) versus intensidade de fluorescência ($y = 3.10^6 + 29047$; $r = 0,9974$).....54

Figura 22. Espectro de varredura da Ftalocianina de Cloro e Alumínio, em acetonitrila, incorporada na PAMT, por espectrofotômetro de absorção no UV/Vis (A) e emissão de fluorescência (B), com excitação em 615 nm, máximo de emissão de fluorescência em 674 nm, e aberturas de emissão e excitação em 3 e 3 nm, respectivamente.....55

Figura 23. Espectro de varredura da Ftalocianina de Cloro e Alumínio, em acetonitrila, incorporada na PAMQ, por espectrofotômetro de absorção no UV/Vis e emissão de fluorescência, com excitação em 615 nm e máximo de emissão de fluorescência em 674 nm, aberturas de emissão e excitação ajustadas em 3 e 3 nm, respectivamente.....56

Figura 24. Espectro de varredura da curcumina, em acetonitrila, incorporada na PAMQ, por espectrofotômetro de absorção no UV/Vis e emissão de fluorescência, com excitação em 430 nm, máximo de emissão de fluorescência em 539 nm, e aberturas de emissão e excitação ajustadas em 3 e 3 nm, respectivamente.....57

Figura 25. Espectro de varredura dos fotossensibilizadores AlClPc e curcumina associados, em acetonitrila, incorporada na PAMQ, por espectrofotômetro de absorção UV/Vis (A) e fluorescência (B), respectivamente. Para a emissão de fluorescência de AlClPc, o comprimento de onda de excitação foi ajustado em 615 nm, máximo de emissão de fluorescência em 674 nm e aberturas de emissão e excitação em 3 e 3 nm, respectivamente; e para a emissão de fluorescência de curcumina, o comprimento de onda de excitação foi ajustado em 430 nm, máximo de emissão de fluorescência em 538 nm e aberturas de emissão e excitação em 3 e 3 nm.....58

Figura 26. Fotografias tiradas com um microscópio de contraste de fase da linhagem celular de glioblastoma humano (U87MG).....61

Figura 27. Ensaio de citotoxicidade celular em linhagem de glioblastoma U87MG incubados durante 3 h com formulações de (A) PAMAIClPc e (B) PAMCurcumina, sem ação de luz, as células foram incubadas nas seguintes concentrações de PAMAIClPc 0,5; 1,0; 3,0 e 5,0 μM e PAMCurcumina 5,0; 10,0; 15,0 e 20,0 μM . Foi feita análise de variância One-Way ANOVA, seguida do pós-teste de Dunnett, considerando o nível de significância $p < 0,05$63

Figura 28. Ensaio de citotoxicidade celular em linhagem de glioblastoma U87MG incubados durante 3 h com formulações de (A) AlClPc livre e (B) curcumina livre, sem ação de luz, e as células foram incubadas nas seguintes concentrações de AlClPc 0,5; 1,0; 3,0 e 5,0 μM e curcumina 5,0; 10,0; 15,0; 20,0 μM . Foi feita análise de variância One-Way ANOVA, seguida do pós-teste de Dunnett, considerando o nível de significância $p < 0,05$63

Figura 29. Ensaio de citotoxicidade celular em linhagem de glioblastoma U87MG incubados durante 3 h com as formulações PAMVazia, PAMAIClPc, PAMCurcumina e PAMAIClPc+Curcumina, sem ação de luz, e as células foram incubadas com 3,0 μM de PAMAIClPc, 10,0 μM de PAMCurcumina, 3,0 e 10,0 μM de PAMAIClPc+Curcumina, respectivamente. Foi feita análise de variância One-Way ANOVA, seguida do pós-teste de Dunnett, considerando o nível de significância $p < 0,05$64

Figura 30. Ensaio de internalização celular em linhagem de glioblastoma U87MG incubados durante 3h (A), 6h (B), e 9h (C), com as formulações PAMVazia, PAMAIClPc, PAMCurcumina e PAMAIClPc+Curcumina, sem ação de luz. As células foram incubadas com 3,0 μM de PAMAIClPc, 10,0 μM de PAMCurcumina, 3,0 e 10,0 μM de PAMAIClPc+Curcumina. Foi feita análise de variância One-Way ANOVA, seguida do pós-teste de Dunnett, considerando o nível de significância $p < 0,05$66

Figura 31. Ensaio de fototoxicidade usando o teste de viabilidade MTT após incubação com as formulações de PAMQAlClPc (C), AlClPc livre (D), PAMQCurcumina (E), e Curcumina livre (F) nas células U87MG e posterior irradiação com diferentes doses para a AlClPc (70, 200, 500, e 700 mJ cm^{-2}), com feixe de excitação em 675 nm, e para a curcumina (500, 1000, 1500, e 2000 mJ cm^{-2}), com feixe de excitação em 418 nm. Neste ensaio usou-se como controle negativo apenas com células (0 mJ.cm^{-2}) e um controle do laser (A e B), ou seja, células e irradiação de todas as dosagens. Foi

realizado a análise de variância One-Way ANOVA, seguida do pós-teste de Dunnett ($*p < 0,05$ comparado ao controle de 100%).....68

Figura 32. Ensaio de fototoxicidade usando o teste de viabilidade MTT após incubação de 3 horas com a PAMQAlClPc+Curcumina, nas células U87MG e posterior irradiação dose de energia de 500 mJ cm^{-2} para a AlClPc, com feixe de excitação em 675 nm, e dose de energia de 2000 mJ cm^{-2} para a curcumina, com feixe de excitação em 418 nm. Neste ensaio usou-se como controle negativo apenas com células (0 mJ.cm^{-2}). Foi realizada a análise de variância One-Way ANOVA, seguida do pós-teste de Dunnett ($*p < 0,05$ comparado ao controle de 100%).....70

Figura 33. Ensaio de fototoxicidade usando o teste de viabilidade MTT após incubação de 3 horas com a PAMQAlClPc+Curcumina, nas células U87MG e posterior irradiação dose de energia de 500 mJ cm^{-2} para a AlClPc, com feixe de excitação em 675 nm, e dose de energia de 2000 mJ cm^{-2} para a curcumina, com feixe de excitação em 418 nm. Figura A refere-se aos experimentos controle: (1) PAMQAlClPc+Curcumina com aplicação de luz em 500 mJ cm^{-2} em 675 nm, (2) PAMQAlClPc+Curcumina com aplicação de luz em 2000 mJ cm^{-2} em 418 nm, (3) PAMQAlClPc com aplicação de luz em 2000 mJ cm^{-2} em 418 nm, e (4) PAMQCurcumina com aplicação de luz em 500 mJ cm^{-2} em 675 nm. A figura B refere-se ao experimento com diferentes tempos de irradiação. Foi realizada a análise de variância One-Way ANOVA, seguida do pós-teste de Dunnett ($*p < 0,05$ comparado ao controle de 100%).....71

Figura 34. Ensaio de fototoxicidade da PAMQAlClPc (3uM) em célula U87MG com diferentes doses de irradiação (70, 200, 500, e 700 mJ cm^{-2}), com feixe de excitação em 675 nm, potencia do laser em 20 mW, no laser pulsado Brilliant b com sistema OPO Rainbow (A) e no laser contínuo Eagle 2W-630 nm (B). Neste ensaio usou-se como controle negativo apenas com células (0 mJ.cm^{-2}) e um controle do laser (CT 700 mJ). Foi realizada a análise de variância One-Way ANOVA, seguida do pós-teste de Dunnett ($*p < 0,05$ comparado ao controle de 100%).....74

Figura 35. Imagens da microscopia confocal da célula de glioblastoma humano (U87MG) incubada com os fármacos fotossensibilizadores AlClPc (A), curcumina (B), e a conjugação AlClPc-curcumina (C). A primeira coluna representa o núcleo celular corado com DAPI (azul) e o resultado da emissão de fluorescência do fármaco

fotossensibilizador; a segunda coluna representa o citoesqueleto corado com faloidina (verde) e o resultado da emissão de fluorescência do fármaco fotossensibilizador; e a terceira coluna é o resultado da sobreposição do núcleo, citoesqueleto e fármaco fotossensibilizador. A AlClPc apresenta coloração vermelha, enquanto que a curcumina apresenta coloração amarela. Escala: 10µm.....76

Lista de Tabelas

Tabela 1. Ensaios <i>in vitro</i> de fotocitotoxicidade (A e B) da PAMAlClPc+Curcumina no tempo zero, com intervalo de irradiação de 3 horas (I) e de 6 horas (II), alternando a aplicação do laser com feixe de excitação em 675 nm (AlClPc) com dose de luz em 500 mJ cm ⁻² e do laser com feixe de excitação em 418 nm (curcumina) com dose de luz em 2000 mJ cm ⁻²	33
Tabela 2. Resultado da caracterização de diferentes lotes de formulação vazia e contendo o fármaco AlClPc.....	36
Tabela 3. Resultado da caracterização das formulações da PAMQ Vazia e com os fotossensibilizadores AlClPc e curcumina.....	38
Tabela 4. Taxa de separação representada pela inclinação dos estudos de estabilidade.....	51
Tabela 5. Quantificação dos fotossensibilizadores encapsulados nas formulações de PAMT e PAMQ.....	59

Lista de abreviaturas e siglas

$^1\text{O}_2$	Oxigênio Singleto
AlClPc	Ftalocianina de cloro-alumínio
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC®	American Type Culture Collection
CT	Controle
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio Padrão
EMP	Erro médio padrão
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FDA	Food and Drug Administration
FS	Fármaco fotossensibilizante
GBM	Glioblastoma Multiforme
HSA	Human Serum Albumin
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IPd	Índice de polidispersão
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MFA	Microscopia de força atômica
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAMQ químico	Nanopartícula de albumina obtida pelo <i>crosslinking</i>
PAMQAlClPc	Nanopartícula de albumina contendo ftalocianina de cloro alumínio
PAMQAlClPc+Curcumina	Nanopartícula de albumina contendo ftalocianina de cloro alumínio e curcumina
PAMQCurcumina	Nanopartícula de albumina contendo curcumina
PAMQVazia	Nanopartícula de albumina vazia

PAMT térnico	Nanopartícula de albumina obtida pelo <i>crosslinking</i>
PAMTAICIPc alumínio	Nanopartícula de albumina contendo ftalocianina de cloro
PAMTVazia	Nanopartícula de albumina vazia
PLGA	Copolímero poli-láctico- <i>co</i> -glicólico
S ₀	Estado fundamental
S ₁	Estado singleto excitado
SFB	Soro fetal bovino
SNC	Sistema Nervoso Central
T ₁	Estado tripleto excitado
TFD	Terapia Fotodinâmica
TMZ	Temozolamida
U87MG	Linhagem de Glioblastoma Humano
UV-Vis	Ultravioleta-visível
v/v	volume/volume
ε	Absortividade molar
λ	Comprimento de onda de radiação eletromagnética

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	xii

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Câncer.....	1
1.1.1. Glioblastoma Multiforme.....	2
1.2. Processos Fotodinâmicos.....	3
1.2.1. Agentes Fotossensibilizantes	6
1.2.1.1. Ftalocianinas.....	8
1.2.1.2. Curcumina.....	11
1.3. Nanotecnologia	12
1.3.1. Nanopartículas de Albumina.....	14
2. OBJETIVOS.....	17
2.1. Objetivo Geral.....	17
2.2. Objetivos Específicos.....	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
3.1. Materiais.....	18
3.2. Desenvolvimento da Nanopartícula de Albumina pelo método do <i>crosslinking</i> térmico (PAMT).....	18
3.3. Desenvolvimento da Nanopartícula de Albumina pelo método do <i>crosslinking</i> químico (PAMQ).....	19
3.4. Caracterização Físico Química das Nanopartículas.....	21
3.4.1. Determinação do tamanho da partícula e potencial zeta.....	21
3.4.2. Quantificação dos fármacos incorporados nas formulações.....	22

3.4.3. Determinação da quantidade de AlClPc e/ou curcumina incorporados nas formulações.....	22
3.4.4. Análise Morfológica por microscopia de força atômica (MFA).....	23
3.5. Estudo de Estabilidade das formulações PAMT e PAMQ.....	24
3.6. Caracterização da estabilidade acelerada das formulações.....	24
3.7. Linearidade de AlClPc e Curcumina.....	25
3.7.1. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ).....	26
3.8. Ensaios <i>in vitro</i> de citotoxicidade e fotocitotoxicidade em cultura celular de linhagem de glioblastoma humano U87MG.....	26
3.8.1. Micrografia de cultura celular.....	27
3.8.2. Ensaios <i>in vitro</i> de compatibilidade biológica (citotoxicidade) dos fármacos AlClPc e curcumina.....	27
3.8.2.1. Ensaios <i>in vitro</i> para determinação do tempo de internalização celular adequado para as formulações contendo AlClPc e/ou Curcumina.....	28
3.8.3. Ensaios <i>in vitro</i> de fotocitotoxicidade dos fármacos AlClPc e curcumina.....	29
3.8.3.1. Ensaios <i>in vitro</i> de fotocitotoxicidade da AlClPc comparando o laser com energia contínua e o laser com energia pulsada.....	30
3.8.3.2. Ensaios <i>in vitro</i> de fototoxicidade em diferentes tempos de irradiação.....	31
3.8.4. Ensaio de viabilidade celular (MTT).....	33
3.9. Microscopia Confocal.....	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	36
4.1 - Nanopartícula de Albumina obtida pelo <i>Crosslinking</i> Térmico.....	36
4.2 - Nanopartícula de Albumina obtida pelo <i>Crosslinking</i> Químico.....	37
4.3. Caracterização Físico Química das Nanopartículas.....	39
4.3.1. Estudo de estabilidade das formulações PAMT e PAMQ.....	39
4.3.2. Microscopia de Força Atômica (MFA).....	43

4.4. Estabilidade Acelerada das Formulações.....	47
4.5. Linearidade da Ftalocianina de Cloro Aluminio (AlClPc) e Curcumina.....	51
4.5.1. Limites de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ).....	55
4.6. Estudo de espectroscopia de absorção e emissão de fluorescência no UV-Vis e determinação da taxa de associação dos fotossensibilizadores incorporados a nanopartícula de albumina.....	55
4.7. Ensaios <i>in vitro</i> em cultura celular de linhagem de glioblastoma humano U87MG.....	60
4.7.1. Micrografia Celular.....	60
4.7.2. Ensaios <i>in vitro</i> de compatibilidade biológica (citotoxicidade).....	62
4.7.2.1. Ensaios <i>in vitro</i> para determinação do tempo de internalização celular adequado para as formulações contendo AlClPc e/ou Curcumina.....	64
4.7.3. Ensaios <i>in vitro</i> de fototoxicidade.....	67
4.7.3.1. Ensaios <i>in vitro</i> de fototoxicidade em diferentes tempos de irradiação.....	70
4.7.4. Ensaios <i>in vitro</i> de fototoxicidade da AlClPc comparando o laser com energia contínua e o laser com energia pulsada.....	72
4.8. Microscopia Confocal.....	74
5. CONCLUSÃO.....	77
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA.....	79

1 – INTRODUÇÃO

1.1– Câncer

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que tem em comum o crescimento desordenado de células que invadem tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo, num processo denominado de metástase. Essa neoplasia tem sido uma das principais causas de morte no mundo, e os tratamentos convencionais incluem a cirurgia, quimioterapia, radioterapia, e imunoterapias (HARTWELL e KASTAN, 1994; RUI et al., 2016).

Uma célula normal pode sofrer alterações no seu DNA, ocasionando uma mutação genética. Essas células com o material genético modificado passam a receber instruções erradas alterando suas atividades, como a (i) multiplicação de maneira descontrolada e agressiva, (ii) migração para os tecidos vizinhos formando focos disseminados das metástases, e (iii) perda de função. Deste modo, essas células passam a ser denominadas células cancerígenas, tumorais ou neoplásicas (HARTWELL e KASTAN, 1994; YOU e JONES, 2013).

A incidência de câncer no Brasil vem aumentando a cada ano. O Instituto Nacional de Câncer (INCA) estima que, no ano de 2016, haverá mais de 596 mil casos novos de câncer no país, e segundo a estimativa da Organização Mundial de Saúde (OMS), deve-se esperar 27 milhões de casos de câncer em 2030. No Brasil, o câncer é a segunda causa de morte, e os tipos que mais matam são: (i) pulmão, (ii) mama, (iii) pele, (iv) colo de útero, (v) colo retal, (vi) estômago, (vii) fígado, e (viii) sistema nervoso central (INCA, 2016)

O número de casos de câncer em todo mundo deverá aumentar, segundo dados da Organização Mundial da Saúde (do inglês *World Health Organization*, WHO), em parte devido aos novos hábitos da população dos países em desenvolvimento, como o consumo excessivo de bebidas alcoólicas, tabaco, altos teores de gordura e níveis de colesterol, exposição excessiva a radiação solar, entre outros. Atualmente, 10 milhões de pessoas foram diagnosticados com câncer em todo o mundo, e 6 milhões de pessoas morrerão devido a doença (WHO, 2016; INCA, 2016).

1.1.1 – Glioblastoma Multiforme

O Sistema Nervoso Central (SNC) é constituído por um conjunto de células gliais (astrócitos, oligodendrócitos, microglia, e células endoteliais) que oferecem suporte estrutural e funcional para os neurónios. Glioma ou glioblastoma multiforme (GBM) é um tipo de tumor primário mais comum no SNC, que acomete principalmente os adultos. Os principais sintomas de pacientes com GBM são os sintomas neurológicos como dores de cabeça, perda de memória, alterações de personalidade, epilepsia, e convulsões (FILBIN e STILES, 2015; HOLLAND, 2000; MAHER et al., 2001).

Existem duas teorias que explicam a origem do glioma. A primeira teoria sugere que podem surgir a partir da diferenciação de astrócitos e oligodendrócitos. Já a segunda teoria, e mais aceita, sugere que esses tumores surgem a partir de células progenitoras que sofrem processos de mutações durante seu crescimento. Os gliomas são classificados, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), numa escala de I a IV de acordo com o seu grau de malignidade, onde os tumores de grau I são de baixo grau e menos agressivo, e o de grau IV, como o glioblastoma multiforme, altamente malignos (BECHET et al., 2014; MEIR et al., 2010)

Glioblastoma multiforme (GBM) é o tipo mais comum e agressivo de tumor cerebral em adultos, sendo responsáveis por 3% de todas as mortes por câncer no Brasil, segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA). São resistentes a agentes quimioterápicos, altamente invasivos, e apresentam rápido crescimento, sendo caracterizados por um crescimento multifocal, o que resulta na incapacidade de ressecção completa do tumor. O tempo de vida do paciente diagnosticado com GBM é, em média, 14 meses, apesar dos tratamentos convencionais, como a radioterapia, neurocirurgia, e quimioterapia. Esses tratamentos são ineficazes em razão da capacidade de células anormais repararem o DNA, e da barreira hematoencefálica dificultar o aporte de fármacos ao sistema nervoso central (ALIFIERIS e TRAFALIS, 2015; HOLLAND, 2000; LOPES, CASTILHO-FERNANDES e TEDESCO, 2012; MAHER et al., 2001; STYLLI et al., 1995; TRAN e ROSENTHAL, 2010) (INCA, 2016).

A barreira hematoencefálica (BHE) tem como função fornecer nutrientes e oxigênio ao cérebro, assim como protegê-lo de compostos químicos e neurotóxicos presentes no sangue. Desse modo, a BHE é uma barreira protetora que garante o funcionamento do sistema nervoso central (TELLINGEN et al., 2015).

O principal agente quimioterápico utilizado no tratamento de pacientes diagnosticados com GBM é a temozolamida (TMZ), que consiste em um derivado do agente alquilante dacarbazina. A TMZ é muito eficaz em alguns tratamentos de câncer, como o melanoma, porém, o glioblastoma é resistente a este fármaco. Estudos mostram que a resistência ao fármaco está associada ao fato de enzimas repararem o DNA das células tumorais (CHENG et al., 2011; LEE, 2016).

Deste modo, vem sendo estudados novos tratamentos que visam desenvolver fármacos mais seletivos e específicos para os tecidos com tumores desta natureza, e que são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica. A terapia fotodinâmica (TFD), juntamente com a nanotecnologia, são tratamentos alternativos, não invasivos e promissores para o combate do câncer do sistema nervoso central (ALEXIS et al., 2008; BECHET et al., 2008; STYLLI et al., 1995; TRAN e ROSENTHAL, 2010).

1.2 – Processos Fotodinâmicos

Estudos relacionados à utilização de luz visível ou no infra-vermelho próximo com o propósito de tratamento de doenças como raquitismo, vitiligo e câncer de pele foram utilizados há mais de 3 mil anos, pelos egípcios. No entanto, foi apenas no século XIX que a técnica foi melhor estudada e desenvolvida como um tratamento alternativo de tumores, para diagnósticos, na erradicação de microrganismos, entre outras aplicações. Hoje em dia, tem sido muito utilizada como uma forma alternativa para o tratamento coadjuvante de alguns tipos específicos de câncer (CASTANO , MROZ e HAMBLIN, 2006; DOLMANS , FUKUMURA e JAIN, 2003; LONGO et al., 2012; RIBEIRO et al., 2015).

A Terapia Fotodinâmica consiste na combinação de um fármaco fotossensibilizador (FS) e luz visível, que, na presença de oxigênio molecular pode produzir agentes citotóxicos extremamente reativos que podem inativar células tumorais. O fármaco fotossensibilizante é introduzido no paciente, por via tópica, sistêmica ou parenteral, e se acumula preferencialmente em células que se reproduzem rapidamente. A partir dos mecanismos fotodinâmicos (Figura 1), as moléculas de FS absorvem a luz, de comprimento de onda correspondente ao seu máximo de absorção, e transferem parte da energia absorvida para produção de espécies radicalares via

foto-oxidação de oxigênio molecular para produção de oxigênio singlete (denominado reações fotodinâmicas do Tipo II) ou indução de espécies radicalares oxidativas como ânion superóxido, peróxido, entre outros (denominado reações fotodinâmicas do Tipo I) classificados de forma geral como espécies reativas de oxigênio, EROS ou ROS (do inglês, *Reactive Oxygen Species*) (BHATTA , KEYAL e WANG, 2016; CASTANO , MROZ e HAMBLIN, 2006; MICHELS, 2003; NYMAN e HYNNINEN, 2004; ONISZCZUKA et al., 2016).

Figura 1. Fluxograma representativo das etapas de fotossensibilização e dos mecanismos fotodinâmicos (reações fotodinâmicas do Tipo I e II).

Fonte: adaptado de DOLMANS, D.E.J.G.J., 2003 (DOLMANS , FUKUMURA e JAIN, 2003)

No mecanismo de fotossensibilização do tipo I, ocorre transferência energética via transferência de elétrons, do FS no estado triplete excitado, por meio de reações radicalares, para as biomoléculas próximas, resultando em danos oxidativos a esses substratos. Esses radicais por sua vez podem interagir com o oxigênio molecular do meio, formando produtos oxigenados reativos como o peróxido de hidrogênio, superóxidos e radical hidroxil. Já no mecanismo de fotossensibilização do tipo II, ocorre a transferência direta de energia do estado triplete para o oxigênio molecular, resultando na formação do oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), que é uma espécie extremamente eletrofílica, ou seja, muito reativa, resultando em danos oxidativos as espécies biológicas (proteínas, colesterol, fibroblastos, DNA, biomembranas, entre outras), que por fim resultará em

morte celular por necrose ou apoptose (DOLMANS , FUKUMURA e JAIN, 2003; FARIA et al., 2015; ITRI et al., 2014; ONISZCZUKA et al., 2016).

A TFD pode atuar de diversas maneiras no organismo, podendo agir diretamente sobre as células cancerígenas, ocasionando a morte celular por necrose e/ou apoptose; ou pela interrupção de fornecimento de oxigênio ao tumor, devido o consumo do mesmo durante a formação de espécies reativas de oxigênio. A morte celular por necrose é geralmente descrita como um dano bruto a alguma estrutura celular, ocasionando o rompimento da membrana celular entre outros efeitos em organelas citoplasmáticas. Já a apoptose é a morte celular programada, onde a célula sofre diversas reações em cadeia, se fragmentando e sofrendo o processo de fagocitose. Os tratamentos realizados com base na TFD podem levar a uma maior seletividade na destruição dos tecidos afetados, uma vez que somente as células expostas ao fármaco fotossensibilizador e a luz, de comprimento de onda específico, simultaneamente, na presença de oxigênio, conseguem induzir a formação dos agentes citotóxicos necessários ao processo. Desta forma, a TFD permite a erradicação somente do tecido tumoral desejado (CASTANO , MROZ e HAMBLIN, 2006; HEINRICH et al., 2013; LUNARDI e TEDESCO, 2005; PRIMO et al., 2007; TARDIVO et al., 2005).

Um fármaco fotossensibilizante no seu estado fundamental, se encontra com os elétrons emparelhados, com *spins* contrários. Pela absorção de luz monocromática na forma de fótons o mesmo é induzido às transições eletrônicas moleculares entre o estado fundamental (S_0) e um estado de maior nível energético, o estado singleto excitado (S_1), sem mudança de *spin*. Após a excitação, ocorre o decaimento da energia, por processos de relaxação física conhecidos como conversão interna de calor ou através da emissão de fótons por fluorescência. Ou ainda, este fármaco fotossensibilizante no estado singleto excitado pode sofrer cruzamento inter-sistemas, quando tem energia suficiente para inverter o *spin*, ficando com elétrons desemparelhados, e deste modo, formando o estado excitado tripleto (T_1). Este estado excitado tem tempo de vida mais longo, na escala de microssegundos, e quando volta ao estado fundamental emite luz por fosforescência. A ação fotodinâmica do fármaco fotossensibilizador é dependente da formação do estado excitado tripleto, pois o mesmo é responsável pela formação dos dois tipos de mecanismos fotoquímicos descritos anteriormente (reação do tipo I ou reação do tipo II). Todas essas transições podem ser descritas por meio do diagrama de Jablonski, apresentado na figura 2 (CAMERIN et al.,

2010; DOLMANS , FUKUMURA e JAIN, 2003; HEINRICH et al., 2013; ITRI et al., 2014; KUDINOVA e BEREZOV, 2008; ONISZCZUKA et al., 2016; SHARMAN , ALLEN e VAN LIER, 1999).

Figura 2. Diagrama de Jablonski simplificado, ilustrando as transições eletrônicas que dão origem aos mecanismos fotodinâmicos de fotossensibilização molecular. S₀ - Estado fundamental; S₁- estado singlete excitado; T₁- estado triplete excitado.

Fonte: adaptado de Konan, Y.N., 2002 (KONAN , GURNY e ALLEMANN, 2002)

Os fatores que afetam a extensão do dano fotodinâmico para a célula e a eficácia da terapia fotodinâmica podem ser descritos a partir da investigação de propriedades fotofísicas e fotoquímicas como: (i) tipo de FS, (ii) localização intra e extracelular, (iii) quantidade de FS administrada, (iv) disponibilidade de oxigênio, e (v) duração da exposição à luz. As limitações da TFD podem estar relacionadas com as propriedades ópticas do tecido, pois estas influenciam a penetração da luz, e a intensidade de luz utilizada para a penetração no tecido (DETTY , GIBSON e WAGNER, 2004; JAYME , CALORI e TEDESCO, 2016).

1.2.1 - Agentes Fotossensibilizadores

Os FS são moléculas cromóforas capazes de absorver luz de determinada faixa de comprimento de onda (300 nm a 800 nm) produzindo agentes citotóxicos letais para o tecido doente. Existem muitos tipos de FS capazes de realizar essa função, alguns

exemplos são: porfirinas (Photofrin®), hematoporfirina, ftalocianinas e seus derivados, curcuminóides e seus derivados, clorinas, azul de metileno, rosa bengala, entre outros (figura 3) (ALLISON e SIBATA, 2010; MARANHO et al., 2009; SHARMAN , ALLEN e VAN LIER, 1999; SPAGNUL , TURNER e BOYLE, 2015).

Figura 3. Estrutura química representativa de alguns fotossensibilizadores: (A) azul de metileno e (B) rosa bengala.

Fonte: autores.

A primeira classe de fármacos fotossensibilizadores utilizados para o tratamento fotodinâmico foram os derivados de hematoporfirina, sendo que o primeiro a ser aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration) para a comercialização foi o Photofrin® (CASTANO , MROZ e HAMBLIN, 2006; DABROWSKI et al., 2016; DOLMANS , FUKUMURA e JAIN, 2003). Os ensaios clínicos realizados com Photofrin® nos Estados Unidos, França, Holanda e Japão, mostraram bons resultados como sensibilizadores no tratamento fotodinâmico de diversos tipos de câncer, como do esôfago e de pulmão. Porém, essa primeira geração de fotossensibilizadores apresentaram índices significantes de toxicidade, e baixa seletividade com respeito a incorporação por células tumorais, e deste modo, as limitações do uso deste fármaco levou ao desenvolvimento de novos fotossensibilizantes para este propósito, que são chamados de fotossensibilizadores de segunda e terceira geração (ALLISON et al., 2008; CALORI e TEDESCO, 2016; DOUGHERTY e MARCUS, 1992; SHARMAN , ALLEN e VAN LIER, 1999; TEDESCO , ROTTA e LUNARDI, 2003)

A segunda geração de fotossensibilizadores (derivados de ftalocianinas, derivados de curcuminoides, clorinas, azul de metileno, entre outros) absorvem em comprimentos de onda maiores, com elevada absortividade molar na região do vermelho (600-800nm), resultando em uma resposta fototerapêutica mais eficiente. Já a terceira geração de fotossensibilizadores são desenvolvidos para terem especificidade pelo tecido biológico de interesse (CASTANO , MROZ e HAMBLIN, 2006; DOUGHERTY, 2002; SENGE, 2012).

Para muitos cientistas, o elemento mais importante para a TFD está associado à escolha do tipo do fármaco fotossensibilizador (DETTY , GIBSON e WAGNER, 2004). Este deve apresentar os seguintes requisitos para que seja considerado ideal a sua utilização na TFD: (i) ser quimicamente puro e de composição conhecida, (ii) apresentar toxicidade mínima no escuro, (iii) ser facilmente retido pelo tecido doente, (iv) ser rapidamente excretado do corpo, considerando sua vida média entre a aplicação do mesmo, sua ativação e eliminação (v) ter alta penetração no tecido, (vi) alta produção de espécies reativas de oxigênio, (vii) ter alta absorção no comprimento de onda de ativação, traduzido respectivamente por um elevado coeficiente de absortividade, e (viii) ter propriedades hidrofóbicas e hidrofílicas equilibradas (CALORI e TEDESCO, 2016; DETTY , GIBSON e WAGNER, 2004; LUNARDI e TEDESCO, 2005; TEDESCO , ROTTA e LUNARDI, 2003).

1.2.1.1 – Ftalocianinas

A ftalocianina é um FS que foi desenvolvida, primeiramente, para ser utilizada como pigmento de baixo custo para recobrimento de mídias digitais, e agora tem sido estudada como uma classe de molécula altamente interessante na terapia fotodinâmica para o tratamento do câncer (CLAESSENS , HAHN e TORRES, 2008; LUNARDI e TEDESCO, 2005; TEDESCO , ROTTA e LUNARDI, 2003). A ftalocianina tem origem grega, onde o termo “ftalo” significa óleo de pedra, e “cianina” significa azul escuro. Essa molécula consiste em estruturas aromáticas bidimensionais de 18 elétrons do tipo π , com 4 subunidades ligadas por átomos de nitrogênio. Essa estrutura pode ser relacionada com a porfírina, pois apresenta um metal central e vários ligantes axiais, que permitem substituições. Compostos de ftalocianina tem diversas aplicações na

indústria biotecnológica e farmacêutica devido as suas propriedades fotoquímicas, fotofísicas e fotobiológicas (Figura 4) (ANDERSON et al., 1997; BERLANDA et al., 2010; CALORI e TEDESCO, 2016; TEDESCO , PRIMO e BELTRAME, 2016).

Figura 4. Estrutura química representativa de uma ftalocianina base livre, sendo M = metal central, R = substituintes axiais.

Fonte: Sigma-Aldrich

Compostos ftalocianínicos (do inglês, *phthalocyanines* ou, *PCs*) absorvem fortemente ao redor de 675 nm e possuem um valor de coeficiente de absorvidade molar (ϵ) maior que $100.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Ftalocianinas e seus derivados apresentam uma serie de vantagens frente aos derivados de hematoporfirina, pois são relativamente fáceis de sintetizar, de elevada pureza, resistentes a degradação química e fotoquímica, geradoras de oxigênio singleto, e absorvem dentro da Janela Terapêutica (600-800nm), ou seja, a faixa de comprimento de onda na qual a penetração da luz no tecido é maior sem interferência de cromóforos endógenos do sistema biológico (DAZIANO et al., 1998; DETTY , GIBSON e WAGNER, 2004; DE PAULA et al., 2015b; FRANCHI et al., 2016; GAO et al., 2001; NUNES , SGUILLA e TEDESCO, 2004)

A ftalocianina é um composto essencialmente hidrofóbico, mas a solubilidade pode ser ajustada substituindo grupos funcionais nas cadeias laterais da molécula, ou fazendo pequenas alterações nos substituintes periféricos da molécula (RODRIGUES et al., 2012; SESALAN , KOCA e GUL, 2008; TEDESCO , ROTTA e LUNARDI, 2003). A insolubilidade em água afeta a biodisponibilidade e distribuição do fármaco fotossensibilizador. Derivados de ftalocianina também são pouco solúveis em solventes orgânicos comuns, resultando em uma desvantagem para sua utilização na terapia

fotodinâmica, o que é estrategicamente solucionado empregando-se nanotecnologia farmacêutica (JAYME , CALORI e TEDESCO, 2016; SAKAMOTO et al., 2004)

Mais de 60 tipos de átomos metálicos ou não metálicos podem ser incorporados na estrutura cíclica dos ftalocianínicos. A substituição de grupos volumosos apolares, como grupo alquila, pode alterar sua solubilidade em meio orgânico, e substituintes aniônicos ou catiônicos, como grupos carboxi, sulfato, e fosfato, resultam em produtos solúveis em meio aquoso. As propriedades fotofísicas das ftalocianinas são fortemente influenciadas pela presença e natureza do íon metálico central, refletindo nas variações no rendimento quântico do estado excitado tripleto e no tempo de vida desse estado excitado. A formação de complexo com íons paramagnéticos como Cu^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} , V^{2+} , Cr^{3+} , Pd^{2+} resultam em um estado tripleto mais curto, enquanto que a formação de complexos com íons diamagnéticos como Zn^{2+} , Al^{3+} , Ga^{3+} aumentam o tempo de vida e o rendimento quântico do estado tripleto (ALLEN , SHARMAN e VAN LIER, 2001; SESALAN , KOCA e GUL, 2008; TEDESCO , PRIMO e BELTRAME, 2016).

Estudos utilizando a ftalocianina de cloro alumínio (AlClPc) mostraram que esse fármaco mantém todas as suas propriedades fotofísicas e fotoquímicas quando administrado com um nanocarreador. A ftalocianina de cloro alumínio (Figura 5) é um fármaco fotossensibilizador muito hidrofóbico que gera agregados em soluções aquosas, ocasionando a diminuição da sua atividade fotodinâmica. Como estratégia para impedir a agregação e manter todas as propriedades fotoquímicas e fotofísicas, esse fotossensibilizador deve ser administrado com um nanocarreador, utilizando a nanotecnologia. A associação deste com proteínas do soro, como a albumina, também é uma estratégia para a sua absorção preferencial nos tecidos tumorais (JAYME , CALORI e TEDESCO, 2016; MORAIS et al., 2015; NUNES , SGUILLA e TEDESCO, 2004; TEDESCO , PRIMO e BELTRAME, 2016).

Figura 5. Estrutura química representativa ftalocianina de cloro e alumínio (cloro(29H, 31H) ftatocianato de alumínio).

Fonte: Sigma-Aldrich

1.2.1.2 – Curcumina

Outra classe química de fármaco fotossensibilizador que começa a ser utilizada na TFD é a cúrcuma e os derivados de curcuminóides. A curcumina (Figura 6) é um polifenol hidrofóbico amarelo alaranjado, extraído da raiz de *Curcuma longa L.* Essa molécula é amplamente utilizada na medicina tradicional chinesa, devido as suas propriedades potenciais quimioterápicas, anti-inflamatórias e antioxidantes, e hoje em dia seu uso é aprovado pela FDA. Algumas dessas ações farmacológicas são intensificadas quando se irradia a curcumina, e deste modo, este fármaco apresenta grande potencial para ser utilizado como agente fotossensibilizador (KOON et al., 2006; MAHESHWARI et al., 2005; PASCHOAL et al., 2013; RUBY et al., 1995).

Figura 6 – Estrutura química da curcumina, (E,E)- 1,7 bis (4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona, utilizado como compostos fotossensibilizador.

Fonte: Sigma-Aldrich

Esse fármaco fotossensibilizador possui atividades biológicas desejadas para aplicação na terapia fotodinâmica, pois absorvem preferencialmente na faixa de

400-430 nm (SHEN , JI e ZHANG, 2005). De fato, diversas pesquisas revelaram que a curcumina e seus derivados contribuem para a inibição da formação e do crescimento tumoral pelo método da terapia fotodinâmica (DUVOIX et al., 2005; HARIHARAN et al., 2012). Estudos mostraram que o mesmo tem um efeito quimio-preventivo em câncer de cólon, estômago, esôfago e bucal (HATCHER et al., 2008; MAHESHWARI et al., 2005). Além disso, curcuminóides e seus derivados apresentam grande potencial contra doenças crônicas, cardiovasculares, doenças de pele, neurológicas e inflamatórias (DEROSA et al., 2016; PRIYADARSINI, 2009)

Porém estas aplicações da curcumina são limitadas pela sua natureza hidrofóbica, o que dificulta a sua utilização no meio biológico. Curcuminóides são insolúveis em água em pH 7, porém são solúveis em muitos solventes orgânicos, como o metanol, clorofórmio, acetonitrila, etanol, entre outros. Deste modo, devido a sua baixa solubilidade em solução aquosa, esse fármaco é encapsulado em nanopartículas para serem entregues na célula alvo. Portanto, a utilização da nanotecnologia pode aumentar a biodistribuição e biodisponibilidade da curcumina no meio biológico (CORADINI et al., 2015; PRIYADARSINI, 2009; WIKENE et al., 2014).

1.3 – Nanotecnologia: Sistemas de Liberação de Fármacos

O maior objetivo da indústria farmacêutica é de desenvolver agentes terapêuticos que maximizam o efeito do fármaco direcionando-o seletivamente para áreas específicas do corpo. Ao mesmo tempo existem muitos compostos promissores, mas que apresentam propriedades físico-químicas indesejáveis, como a baixa solubilidade e biodistribuição, e, portanto, a melhor maneira de se obter boas propriedades físico-químicas e uma farmacocinética e farmacodinâmica apropriadas é de criar uma maneira de associar o fármaco desejado à um sistema de veiculação. Deste modo, a nanotecnologia vem crescendo e se tornando uma grande influência tanto na área acadêmica quanto na indústria (BERTRAND et al., 2014; KINGSLEY et al., 2006; LOPEZ-LOURENTE e VALCARCEL, 2016).

A utilização da nanotecnologia no desenvolvimento e na descoberta de novos sistemas de veiculação de fármacos é apenas uma de muitas áreas que a mesma pode atuar, podendo ser utilizada também para a liberação controlada de fármacos, diagnósticos *in vitro*, técnicas de terapia gênica, e engenharia de tecidos

(CARUTHERS, WICKLINE e LANZA, 2007; JAIN, 2005; SAHOO , DIINAWAZ e KRISHNAKUMAR, 2008; SHI et al., 2010; ZHANG e WEBSTER, 2009). No entanto, a maioria das pesquisas neste campo estão voltadas para aplicação em oncologia, buscando a utilização de nanocarreadores com especificidade e seletividade por alvos tumorais (BERTRAND et al., 2014; MEI et al., 2013).

O primeiro sistema de liberação de fármacos descrito na literatura na década de 60 foram os sistemas lipossomais, os quais consistem em vesículas formadas por bicamadas fosfolipídicas, as quais possuem biocompatibilidade e capacidade de alterar a especificidade e toxicidade de fármacos {Egbaria, 1990 62 /id;Mezei, 1980 63 /id; Zorzi, 2015 186 /id}. Os lipossomas permitem solubilizar fármacos hidrofóbicos em água, mantendo suas características físico-químicas (HOEBEKE, 1995). Porém, com o surgimento da nanotecnologia, foram desenvolvidos vários tipos de sistemas poliméricos, os quais possuem propriedades diferenciadas e de melhor desempenho terapêutico comparados ao lipossoma. Algumas dessas vantagens são: (i) aumento da atividade terapêutica, (ii) maior solubilidade de fármacos hidrofóbicos, (iii) liberação controlada de fármacos de forma contínua e seletiva, e (iv) proteção química do fármaco contra a degradação (MEI et al., 2013; SAHOO , DIINAWAZ e KRISHNAKUMAR, 2008; SHI et al., 2010; ZORZI et al., 2015).

As nanopartículas se acumulam preferencialmente em células cancerígenas devido ao efeito de permeabilidade e retenção (do inglês, *enhanced permeability and retention effect*, ou EPR), e o diâmetro médio desses nanocarreadores deve ser otimizado dependendo da célula alvo. Esse efeito pode ser devido a deficiência da drenagem linfática da célula, pois os vasos sanguíneos nos tecidos com tumores são irregulares, dilatados e gotejantes, enquanto que os vasos sanguíneos de células normais são compactos. Outro fator relevante é o metabolismo acelerado das células com tumores, pois células cancerígenas apresentam rápido crescimento, fazendo com que essa célula crie ambiente favorável para captar as nanopartículas presentes da corrente sanguínea (LEE et al., 2015; MAEDA, 2001).

Atualmente existem vários tipos de nanocarreadores, os quais se destacam as nanopartículas poliméricas (PATEL et al., 2012), nanopartículas lipídicas sólidas (EKAMBARAM , SHATALI e PRIYANKA, 2011), as nanopartículas magnéticas funcionalizadas (ITO et al., 2005), os nanotubos de carbono (ELHISSI et al., 2011), as nanoemulsões e nanocápsulas poliméricas (CALVO , VILAJATO e ALONSO, 1996;

MORA-HUERTAS , FESSI e ELAISSARI, 2009), entre outros (ELZOGHBY , SAMY e ELGINDY, 2012; FAROKHZAD e LANGER, 2009; LANGER et al., 2008; MORA-HUERTAS , FESSI e ELAISSARI, 2009; SEBAK et al., 2010; YIH e AL-FANDI, 2006).

Os sistemas nanoparticulados protéicos são capazes de suportar o *stress* fisiológico, podendo ser administrados via oral ou tópica. Estes sistemas podem ser obtidos a partir de biomoléculas como proteínas, gelatina, colágeno, caseína, e principalmente a albumina, o que confere à esta classe de nanocarreador alta biocompatibilidade, além de maior biodisponibilidade, e de serem facilmente absorvidos pelo organismo (ELZOGHBY , SAMY e ELGINDY, 2012; KINGSLEY et al., 2006; YU et al., 2015).

1.3.1 – Nanopartículas de Albumina

Nanopartículas de albumina utilizadas como sistema de liberação de fármacos ativos foram introduzidas há mais de 30 anos e vem sendo empregadas em protocolos terapêuticos nas áreas de oftalmologia, neurologia, ortopedia, odontologia e oncologia (KUFLEITNER et al., 2010). Em razão do conhecimento da estrutura primária da proteína, estas nanopartículas oferecem várias possibilidades para a modificação de sua superfície, permitindo tanto adsorção química, quanto ligação covalente com o princípio ativo das mesmas, e deste modo, representam um sistema de veiculação atraente (BATTOGTOKH , KANG e KO, 2015; WEBER et al., 2000; KUFLEITNER et al., 2010)

A albumina do soro humano é um dos materiais mais promissores para preparação de sistemas de nanopartículas, pois estas são toleradas pelo corpo humano sem nenhum efeito colateral. A albumina pode ser obtida em quantidades significantes na clara do ovo, no soro bovino e no soro humano (ELZOGHBY , SAMY e ELGINDY, 2012; KUFLEITNER et al., 2010).

O soro albumina humano (do inglês, *Human Serum Albumin* ou, *HSA*) é uma proteína globular constituída de aproximadamente 585 resíduos de aminoácidos, de peso molecular de 65 kDa. Sua concentração no sangue é de aproximadamente 50 mg/mL, representando a maior parte da proteína presente no plasma. Essa proteína é capaz de permear o sistema nervoso central, e até mesmo atravessar a barreira

hematoencefálica, capacidade que confere a este tipo de nanomaterial, grande potencial de utilização em métodos terapêuticos neurológicos (BATTOGTOKH , KANG e KO, 2015; FANALI et al., 2012; KUFLEITNER et al., 2010; LANGER et al., 2008; PERALTA et al., 2013).

As partículas de albumina do soro humano têm sido utilizadas em estudos promissores devido a sua capacidade de acumular-se em tecidos com tumor, devido ao efeito de retenção e permeabilidade (EPR), de serem biodegradáveis, de fácil purificação, reprodutíveis e hidrossolúveis. Os tecidos tumorais possuem alta taxa de vascularização, o que confere a propriedade de maior interação com albumina presente no plasma sanguíneo, favorecendo ainda mais a utilização de sistemas proteicos em tratamento oncológico. Além da utilização no tratamento oncológico, as nanopartículas de HSA podem também ser utilizadas em procedimentos terapêuticos de artrite reumatóide, isquemia, entre outras patologias (BATTOGTOKH , KANG e KO, 2015; ELZOGHBY , SAMY e ELGINDY, 2012; FANALI et al., 2012; LEE et al., 2015; PERALTA et al., 2013)

Existe uma grande variedade de estratégias de incorporação de fármacos que podem ser aplicadas durante o preparo deste tipo de nanopartícula. Entre elas, pode-se citar: (i) incorporação no interior da matriz polimérica durante a preparação, (ii) ligação covalente superficial e (iii) adsorção direta na superfície pré-formada (KUFLEITNER et al., 2010).

Basicamente, existem dois métodos que são mais utilizados para a preparação de nanopartículas a partir de albumina: (i) formação de emulsão e (ii) dessolvatação (LANGER et al., 2003; YANA et al., 2015).

No processo de emulsificação, as nanopartículas são formadas pela homogeneização da fase oleosa contendo a albumina em alta velocidade, seguida de aquecimento, para consequente estabilização da nanopartícula. A emulsão é resfriada e diluída em éter para diminuir a viscosidade do óleo a fim de facilitar a separação de fases por centrifugação (ELZOGHBY , SAMY e ELGINDY, 2012; YANA et al., 2015).

No método da dessolvatação as nanopartículas são obtidas pela adição contínua de etanol em uma solução aquosa de albumina sob agitação constante, em temperatura ambiente. Durante a adição de etanol ocorre a desnaturação da proteína, formando nanopartículas de albumina. Para a estabilização dessas nanopartículas é adicionado um agente de *crosslinking*, que irá promover ligações cruzadas entre as moléculas de

albumina (ELZOGHBY , SAMY e ELGINDY, 2012; LANGER et al., 2003; YEDOMON , FESSI e CHARCOSSET, 2013; YANA et al., 2015).

2 - Objetivos

2.1 – Objetivo Geral

O objetivo deste estudo consiste no desenvolvimento de nanopartículas de soro albumina humana, visando a liberação controlada de princípios ativos fotossensibilizantes para utilização no tratamento fotodinâmico do câncer do sistema nervoso central.

2.2 – Objetivos Específicos

- I. Desenvolver formulações de nanopartículas de albumina contendo os fotossensibilizadores AlClPc e curcumina;
- II. Avaliar as características físico-químicas e a estabilidade das nanopartículas de albumina produzidas, contendo os fármacos fotossensibilizantes;
- III. Determinar as propriedades fotoquímicas e fotofísicas dos fármacos fotossensibilizantes;
- IV. Estudar os efeitos *in vitro* de citotoxicidade e fototoxicidade dos sistemas de nanopartículas de albumina com os fármacos fotossensibilizadores incorporado na linhagem de glioblastoma humano (U87MG).

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Materiais

Ftalocianina de Cloro Alumínio (85% pureza), curcumina (98% pureza), polímero poli(D,L-láctico-coglicólico) (PLGA) 50:50, Pluronic F-68 (Poloxamer 188), óleo mineral, acetonitrila, Span 80, soro albumina humano, corante azul de tripan (~40%), e 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazólio (MTT), todos adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA). Fosfatidilcolina de soja foi obtida de Lipoïd GmbH (Ludwigshafen, Alemanha). Dimetilsulfóxido (DMSO) e acetona foram compradas de J.T.Baker (Mallinckrodt Baker, Phillipsburg, EUA). Éter etílico anidro (Macron). Todos os solventes usados foram grau analítico. Água ultrapura foi obtida de equipamento Millipore – Direct Q (Molshein, França),

Para os estudos *in vitro*, foi utilizada a linhagem de glioblastoma humano (U87MG) de 4º grau obtida da American Type Culture Collection (ATCC®-HTB-14™, Manassas, VA), meio de cultura celular *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM; Gibco BRL, USA), antibiótico – penicilina/estreptomicina (Cultilab), soro fetal bovino (Gibco), e aminoácidos essenciais (Gibco).

3.2 – Desenvolvimento da Nanopartícula de Albumina pelo método do *Crosslinking* Térmico (PAMT)

As nanopartículas de soro albumina humano foram desenvolvidas de acordo com o método da desnaturação por calor, utilizando o agitador mecânico de alta velocidade Ultra Turrax (IKA T25 Basic), implicando na formação de ligações cruzadas (*crosslinking*) em suspensão, como descrito por Weber (WEBER et al., 2000).

Foi adicionado 250 µL do fármaco fotossensibilizador ftalocianina na concentração estoque de 0,4 mM na solução de soro albumina humana (10 mg/mL), sob agitação constante com barra magnética. Para o preparo da fase orgânica foi adicionado 30 mL de óleo mineral contendo de 100 a 500 ul de tensoativo Span80, e a esta solução foi vertida a solução de HSA preparada anteriormente, com agitação constante 10000 rpm pelo sistema Ultra Turrax IKA T25 Basic. Em uma jaqueta termostatzada a 70°C, foram adicionados 70 mL de óleo de girassol e 500ul de tensoativo Span 80, e a esta solução, foi adicionado a emulsão resultante acima, por gotejamento, com agitação

constante, pelo sistema Ultra Turrax. Após a completa adição, a suspensão contendo as nanopartículas de albumina ficou sob agitação magnética constante até atingir temperatura ambiente, para posteriormente, serem submetidas a centrifugação à 4000 rpm, a 25°C, por 30 minutos, na Centrífuga modelo 5810 R, para a separação da fase orgânica. O processo de centrifugação para remoção do sobrenadante (fase oleosa), e separação da nanopartícula foi realizado, utilizando-se éter etílico anidro, para remoção de resíduos, e obtenção das nanopartículas sólidas, as quais foram isoladas em condições assépticas em fluxo laminar (ESCO Class II BBC) com total remoção do éter residual. As formulações foram armazenadas a temperatura ambiente (25°C) em frascos de vidro fechados hermeticamente e protegidos da luz, e o esquema da preparação da nanopartícula está representada na figura 7.

Figura 7. Esquema de preparo da nanopartícula de albumina pelo método da desnaturação por calor (*crosslinking* térmico), obtendo a PAMT encapsulada com AlCIPc e a PAMT vazia, respectivamente. Fonte: autores.

3.3 - Desenvolvimento da preparação da Nanopartícula de Albumina pelo método do *Crosslinking* Químico (PAMQ)

A nanopartícula de albumina humana foi preparada a partir da técnica modificada da dessolvatação descrita por Marty (1978) e Weber (2000) (MARTY, OPPENHEIMER e SPEISER, 1978; WEBER et al., 2000). A preparação desta formulação foi desenvolvida em duas etapas, onde, primeiramente, foi desenvolvida uma pré-formulação pelo método da deposição interfacial de polímero pré-formado, para obtenção de nanocápsula polimérica como descrito por Siqueira-Moura (2010)

(SIQUEIRA-MOURA et al., 2010). A nanocápsula consiste na formação espontânea de gotículas nanométricas oleosas rodeadas por uma membrana polimérica. Posteriormente, essa pré-formulação foi injetada em uma solução de albumina para a formação da PAMQ. O glutaraldeído foi adicionado para a formação de ligações cruzadas.

Para o desenvolvimento da nanocápsula, foi preparada a fase orgânica em um reator de vidro termostatzado a 60°C, sob agitação magnética constante, contendo 15 mL de acetona, fosfatidilcolina de soja, e polímero poli-láctico-*coglicólico* (PLGA) na proporção 1:2, e o fármaco fotossensibilizador (AlClPc, curcumina e a associação de ambos) dissolvido previamente em 250 μ L de óleo mineral sob agitação vigorosa em sistema do tipo *vortex*, modelo Phoenix, para uma concentração final aproximada de 0,25 mM de AlClPc e 0,35 mM de curcumina nas formulações. Em um reator de vidro termostatzado, acoplado em banho a 40°C sob agitação constante, foi preparada a fase aquosa, contendo 30 mL de água Milli-Q e 10% p/v tensoativo Pluronic F-68 (Polaxamer 188). A fase orgânica foi adicionada lentamente na fase aquosa, sob gotejamento com uma pipeta de Pasteur, e agitação constante com barra magnética. Após a homogeneização, o solvente orgânico foi extraído por evaporação sob pressão reduzida (BUCHI Switzerland-Rotavapor, modelo R-215-Vacuum Controller V-855-Vacuum Pump V-700), a 40°C e rotação até volume final de 3 mL.

Figura 8. Esquema de preparo das nanocapsulas. Fonte: autores.

Para a preparação da segunda parte da PAMQ, utilizando o método da dessolvatação, foi feita uma solução aquosa contendo 5 mg/mL de HSA. A nanocápsula preparada anteriormente foi injetada, diretamente em uma jaqueta contendo a solução de

HSA, previamente dissolvida. Foi adicionado 5,0 uL de glutaraldeído 15 %, e a solução mantida sob agitação constante durante 12 horas. Depois deste tempo a solução foi obtida por centrifugação, em uma centrífuga modelo Centrifuge 5810 R, da Eppendorf, a 12.000 rpm, a 25°C, por 45 minutos. O sobrenadante foi descartado, e foi realizada a lavagem da PAMQ com 4mL de água Milli-Q, repetindo-se a centrifugação. Posteriormente, a formulação foi ressuspensa com 4mL de água Milli-Q, homogeneizada e armazenada a 4°C em frascos de vidro hermeticamente fechados e protegida da luz. A figura 9 representa a preparação da nanopartícula de albumina.

Figura 9. Esquema de preparação das nanopartículas de albumina pelo método do *crosslinking* químico, obtendo as formulações de PAMQ: vazia, AIClPc, Curcumina, e AIClPc+Curcumina, da esquerda para a direita. Fonte: autores.

3.4 – Caracterização Físico Química das Nanopartículas

3.4.1 – Determinação do tamanho da partícula e potencial zeta

A análise do tamanho médio das partículas, índice de polidispersidade (IPd) e potencial Zeta foram determinados pelo método do espalhamento de luz dinâmico, através da espectroscopia de correlação de fótons utilizando o equipamento Zetasizer® (Nano ZS, Malvern, PCS Instruments, UK). Para a leitura, foram pesados 0,50 mg da formulação de PAMT, diluídas em 2mL de água Milli-Q, e para a PAMQ as amostras foram diluídas 200 vezes em 2 mL de água Milli-Q.

As análises foram realizadas utilizando-se cubetas de acrílico padronizadas do equipamento, e as amostras foram lidas em triplicata a 25°C, onde o índice de refração para a leitura foi ajustado em 1,450 (proteína). Para a análise do potencial zeta, foi utilizada uma cubeta eletroforética com eletrodos externos para a medida da voltagem

(mV). Para a leitura foi adicionado 10 uL de solução de KCl 0,1M, e os valores do também foram medidos em triplicata.

3.4.2 - Quantificação dos fármacos incorporados nas formulações

A determinação da quantidade de AlClPc na formulação de PAMT foi realizada dissolvendo 40 mg da nanopartícula em 500 uL de DMSO, para garantir total liberação do fármaco da formulação. As medidas de absorção e fluorescência foram realizadas em meio de acetonitrila, onde o volume final adicionado na cubeta para a leitura foi de 2 mL. A leitura foi realizada no espectrofotômetro de absorção UV/VIS, modelo Ultrospec 7000 em 674 nm, que corresponde ao comprimento de onda de máxima absorção da AlClPc, e no espectrofluorímetro, da Horiba Jobin Ivon-Spex modelo *Fluorolog-3*, com excitação fixa em 615 nm e emissão centrada em 674 nm, com fendas de resolução espectral de 3 nm e 3 nm, para excitação e emissão, respectivamente.

Para determinar a quantidade de AlClPc e/ou curcumina na PAMQ foi dissolvido 50 uL da formulação em 50 uL de DMSO, para garantir total liberação do fármaco fotossensibilizador da formulação. As medidas de absorção e fluorescência foram realizadas em acetonitrila, onde o volume final adicionado na cubeta para a leitura foi de 2 mL. A leitura foi realizada no espectrofotômetro de absorção UV/VIS, modelo Ultrospec 7000 em 674 nm, para a AlClPc, e 418 nm, para a curcumina, que corresponde ao comprimento de onda de máxima absorção UV/Vis do fotossensibilizador, e para a leitura no espectrofluorímetro, com excitação fixa em 615 nm e emissão fixa em 674 nm, para a AlClPc e excitação fixa em 430 nm e emissão fixa em 550 nm, para a curcumina (fendas de resolução espectral de 3 nm, e 3 nm respectivamente para excitação e emissão). A velocidade de varredura foi ajustada para 0,2 nm/s, com potência da lâmpada operando a 950.000 W.

3.4.3 – Determinação da quantidade de AlClPc e/ou curcumina incorporado nas formulações

A determinação da quantidade dos fármacos incorporados na PAMQ foi feita conforme a equação abaixo (1):

$$\text{Fármaco incorporado (\%)} = [(TPc - LPc) / TPct] \times 100 \quad (1)$$

Onde, TPc representa a concentração total de fotossensibilizador na formulação, LPc a concentração do fármaco livre presente no sobrenadante da amostra submetida a ultracentrifugação para total separação da fase aquosa, e TPct a concentração teórica de fotossensibilizador (ftalocianina/curcumina).

Para determinar o conteúdo de AlClPc e curcumina encapsulado na PAM foi realizado, inicialmente, a determinação do conteúdo total dos fármacos, adicionando uma alíquota de 60 uL de cada formulação, dissolvendo em DMSO (1:1, v/v) e sonicando por 5 minutos, para garantir total liberação do ativo. Posteriormente, as amostras foram diluídas em 3 mL de acetonitrila e filtrada através do filtro 0,45 uM (Milipore, EUA). A determinação da concentração do fármaco livre não incorporado na formulação foi feito através da ultrafiltração/ultracentrifugação (Microcon Ultracel YM-100, Milipore, Irlanda) a 12.857 x g por 1 h a 4°C. A quantificação do ativo foi feita conforme a curva de quantificação descrita na seção 3.7.

3.4.4 – Análise Morfológica por Microscopia de Força Atômica (MFA)

A MFA tem sido muito utilizada em razão da alta resolução espacial, fornecendo imagens tridimensionais da superfície topográfica das formulações nanométricas independentes da condutividade da amostra. A preparação da amostra utilizou um protocolo relativamente simplificado, onde o nanomaterial é adsorvido em uma superfície suave atômica (mica) e analisada diretamente por detecção do material adsorvido (BAALOUSHA e LEAD, 2013; HARPER, LIEBER e LANSBURY, 1997).

As imagens micrográficas das formulações em estudo foram adquiridas a temperatura ambiente, sem a necessidade de cobertura da amostra, utilizando o equipamento *Scanning Probe Microscope* modelo SPM-9600, da Shimadzu e *software* SPM Online, fornecido pela Shimadzu, do Laboratório de Microscopia de Força Atômica do Departamento de Química da FFCLRP-USP, em Ribeirão Preto. Em uma superfície de mica foi depositada e espalhada uma gota (5,0 µL) das formulações PAMQVazia, PAMQAlClPc, PAMQCurcumina e PAMQAlClPc+Curcumina diluídas 100x. As imagens foram obtidas pelo modo de contato intermitente, com cantilever de 124 µm de comprimento, operando em uma frequência de ressonância no intervalo de

324-369 KHz, rigidez de 34-51 N/m e força constante. Os resultados dimensionais foram processados usando o próprio *software* do programa. No mínimo dez imagens de cada amostra foram analisadas para garantir resultados reprodutíveis.

3.5 – Estudo de Estabilidade das formulações PAMT e PAMQ

As formulações de PAMT foram armazenadas a temperatura ambiente (25°C) e as formulações de PAMQ foram armazenadas a 4°C, e a estabilidade física das formulações foram avaliadas de acordo com o tamanho, índice de polidispersão (IPd) e potencial zeta. As análises foram feitas semanalmente durante 3 meses.

3.6 – Caracterização da estabilidade acelerada das formulações

A caracterização de estabilidade acelerada foi realizada por meio da centrífuga LUMiSizer (LUM GmbH, Alemanha), a qual consiste em um equipamento que mede a intensidade da luz emitida durante a centrifugação em função do tempo e de posição, ao longo de todo o comprimento da amostra. O instrumento emprega o STEP™ - Tecnologia (extinção de perfis resolvido no tempo e no espaço), onde a luz infravermelha ilumina toda a célula de amostra e a luz transmitida é detectada por sensores dispostos linearmente através da amostra, de cima para baixo. A transmissão é então convertida na extinção por $\log I/I_0$ e a concentração das partículas são calculadas. A progressão dos perfis de transmissão contém a informação completa sobre a cinética da amostra devido a formação de floculação, sedimentação, coalescência, natas ou separação de fases. Com base nesses perfis, é possível determinar o perfil de estabilidade da formulação (DETLOFF, SOBISCH e LERCHE, 2007).

A análise foi realizada adicionando 400 µl das amostras, sem diluição anterior, em cubetas retangulares (percurso óptico de 10 mm) e exposto a uma força centrífuga sob 3000 rpm durante 4,4 horas a 25°C, com base nos perfis de transmissão registrados a cada 50 segundos. A integração dos perfis de transmissão e inclinação foram fornecidos pelo *software* original SEPView 5.1 (LUM GmbH, Alemanha). Estes estudos permitiram a diferenciação entre os vários mecanismos de instabilidade, em um ritmo acelerado e em um tempo reduzido drasticamente. A extrapolação do comportamento para tempos mais longos foi utilizada para estimar o tempo de vida de prateleira (*shelf*

life) dos diferentes tipos de formulações estudadas contendo os ativos de interesse. Para calcular o tempo de *shelf life*, utilizou-se a Equação 2:

$$shelf\ life\ (segundos) = (tm_{requerido} \times RCF) \quad (2)$$

Onde, $tm_{requerido}$ é o tempo de duração do experimento, em segundos e RCF é a força centrífuga relativa (valor tabelado de acordo com a Lei de Stokes). Para converter o *shelf life* de segundos para meses, dividiu-se o tempo encontrado em segundos por $3.600\ (1\ h) \times 24\ (1\ dia) \times 30\ (1\ mês)$.

3.7 – Linearidade de AlClPc e Curcumina

A linearidade foi feita utilizando um espectrofotômetro de duplo feixe modelo Ultrospec 7000 e um espectrofluorímetro modelo Horiba Jobin Ivon-Spex *Fluorolog-3* Spectrofluorimeter. O espectro de varredura do espectrofotômetro de absorção UV/Vis para os fármacos fotossensibilizadores AlClPc e curcumina foi ajustado variando de 270-800 nm. Já a emissão de fluorescência para a AlClPc foi analisada entre 630 – 750 nm, com excitação fixa em 615 nm, e as aberturas de emissão e excitação (fendas) foram ajustadas em 3 e 3 nm, e para a curcumina, a emissão de fluorescência foi analisada entre 450 – 650 nm, com excitação fixa em 430 nm, e as aberturas de emissão e excitação (fendas) foram ajustadas em 3 e 3 nm.

Para determinar a linearidade da AlClPc foram construídas cinco curvas para obtenção da curva média analítica de calibração contendo sete concentrações diferentes, variando de 0,5 – 3,00 ug/mL para o espectrofotômetro de absorção UV-Vis e 0,05 – 1,00 ug/mL para o espectrofluorímetro, obedecendo a Lei de Lambert-Beer. Para a curcumina, foram feitas também cinco curvas para obtenção da linearidade média de quantificação, utilizando-se sete concentrações diferentes, variando de 0,2 – 5,00 ug/mL para o espectrofotômetro de absorção UV-Vis e 0,1 – 1,00 ug/mL para o espectrofluorímetro, obedecendo a Lei de Lambert-Beer.

3.7.1 – Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Os limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) para os métodos desenvolvidos foram estimados a partir da curva de calibração resultante do parâmetro da Linearidade. Os LD e LQ foram calculados de acordo com as Equações 3 e 4, respectivamente:

$$LD = (DP/b) \times 3,3 \quad (3)$$

$$LQ = (DP/b) \times 10 \quad (4)$$

Onde, DP é o desvio padrão do intercepto com relação ao eixo dos Y e b o valor da inclinação da curva analítica

3.8 – Ensaios *in vitro* de citotoxicidade e fotocitotoxicidade em cultura celular de linhagem de glioblastoma humano U87MG

Para os estudos *in vitro*, foi utilizada a linhagem de glioblastoma humano (U87MG) de 4º grau (ATCC®-HTB-14™, Manassas, VA), e estas foram cultivadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM; Gibco BRL,USA). Todas as células foram suplementadas com 2 mmol.L⁻¹ de glutamina, 100 U.mL⁻¹ de penicilina, 0.1 mg.mL⁻¹ de estreptomicina e 10% e soro fetal bovino (FBS) e incubadas nas condições de 37°C e 5% CO₂.

As células foram cultivadas até atingirem confluência, e retiradas das garrafas de cultura com solução de tripsina (0,05%). A solução de tripsina foi então inativada pela adição de meio de cultura DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino. Essa solução foi centrifugada, a 200 x g por 5 minutos, as células foram ressuspensas em meio DMEM 10%, e 100 µL desta suspensão foram adicionados a 100 µL de Azul de Tripán 0,4% para contagem das células. Após a homogeneização da solução, 10 µL foram aplicados na câmara de Neubauer, sendo que a contagem foi realizada em microscópio Axiovert 40 CFL (Carl Zeiss, Gottinger, Alemanha) no campo claro na objetiva de aumento de 10x, sendo contados apenas as células viáveis (não coradas com o azul de tripan)

Para ensaios *in vitro* de toxicidade em placa de cultura de 96 poços, foram semeados 1.10^4 células/poço. Após contagem e plaqueamento das células, as placas foram incubadas a 37°C e 5% de CO₂ por 24 horas para garantir adesão e recobrimento celular da área dos poços de cultura.

3.8.1 – Micrografias das culturas celulares

A micrografia de culturas celulares permite a monitoração do crescimento celular. As imagens foram obtidas através do microscópio óptico de alta resolução Axiovert 40 CFL (Carl Zeiss, Gottingen, Alemanha), utilizando-se o conjunto de objetivas A-Plan 10x/0,25 Ph1, acoplado com uma câmera digital AxioCam Zeiss.

As imagens da linhagem celular de glioblastoma humano foram registradas nos frascos com meio DMEN suplementado com 10% de SFB.

3.8.2 - Ensaios *in vitro* de compatibilidade biológica (citotoxicidade) dos fármacos AlClPc e curcumina

Os ensaios *in vitro* de citotoxicidade na ausência de luz foram analisados através de curvas de dose-resposta obtidas pelo ensaio de viabilidade celular de MTT.

As células da linhagem U87MG foram plaqueadas, conforme descrito no item 3.8, o ensaio de citotoxicidade foi realizado com AlClPc e curcumina livre, bem como PAMAlClPc e PAMCurcumina em diferentes concentrações para a linhagem U87MG (AlClPc livre e PAM AlClPc 0,5 µM, 1 µM, 3 µM, e 5µM; curcumina livre 5 µM, 15µM, 20 µM, e 40µM; PAMCurcumina 5µM, 10µM, 15µM, e 20µM). Também foram realizados estudos para os fármacos fotossensibilizadores AlClPc e curcumina associados: PAMAlClPc (3 uM)+Curcumina(10 uM). A toxicidade de AlClPc e curcumina livres foram avaliadas após sua solubilização em DMSO, sendo que a concentração final máxima do solvente utilizado não excedeu 0,3% (v/v), dentro limite utilizado normalmente nos estudos *in vitro* de modo a evitar a citotoxicidade intrínseca do próprio solvente orgânico.

As concentrações citadas acima foram preparadas com meio DMEM 3%, e as células foram incubadas com as amostras por 3 horas. Posteriormente, os meios foram

retirados e substituídos por meio DMEM 10%. Após 24 horas, foi realizado o ensaio padrão de viabilidade celular MTT, conforme descrito na seção 3.8.4. Como controle utilizou-se um conjunto de 16 poços contendo apenas células, e também foi feito o controle positivo, utilizando um conjunto de 16 poços contendo células e as respectivas formulações vazias sem a presença de qualquer fotoativo. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, e os resultados obtidos foram os valores médios da viabilidade celular $\pm$ erro padrão médio (EPM) dos experimentos.

3.8.2.1 – Ensaios *in vitro* para determinação do tempo de viabilidade celular adequado para as formulações contendo AlClPc e/ou Curcumina

O estudo *in vitro* de compatibilidade biológica da linhagem U87MG em diferentes tempos de incubação foi feito com o objetivo de investigar qual intervalo ocorre a melhor internalização celular dos fármacos, sem apresentar efeito tóxico significativo (viabilidade celular maior que 80%). Os ensaios foram feitos nos tempos de 3 h, 6h e 9h, sendo que a concentração de AlClPc e curcumina utilizada foi de 3 μ M e 10 μ M, respectivamente, estabelecido anteriormente no ensaio de citotoxicidade na seção 3.8.2., como a melhor concentração de cada fotoativo, ou seja aquela que apresenta o menor efeito citotóxico na ausência total de estímulo luminoso

As células de glioblastoma humano (U87MG) foram plaqueadas em placas de 96 poços, como descrito na seção 3.8. O meio DMEN 10% foi retirado das placas e substituído por DMEN 3% contendo PAMVazia, PAMAIClPc, PAMCurcumina, PAMAIClPc+Curcumina, e as placas foram incubadas em diferentes tempos (3, 6, e 9h), para avaliar qual intervalo proporciona a melhor viabilidade celular frente as formulações com os ativos. A incubadora foi mantida nas condições de 37°C e 5% CO₂ durante todo o experimento.

Após 3, 6 e 9h de incubação os meios foram retirados e substituídos por DMEM 10%. As placas foram deixadas na incubadora por 24 horas, e posteriormente foi realizado o ensaio padrão de viabilidade celular MTT, conforme descrito na seção 3.8.4. Como controle utilizou-se um conjunto de 16 poços contendo apenas células, e também foi feito o controle positivo, utilizando um conjunto de 16 poços contendo células e

PAMVazia. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, e os resultados obtidos foram os valores médios da viabilidade celular $\pm$ erro padrão médio (EPM) dos experimentos.

3.8.3 – Ensaios *in vitro* de fotocitotoxicidade dos fármacos AlClPc e curcumina

Nos ensaios com aplicação de estímulo luminoso a concentração de AlClPc e curcumina utilizada foi de 3 μ M e 10 μ M, respectivamente, como estabelecida no ensaio de citotoxicidade descrito na seção 3.8.2.

Após as células atingirem confluência e adesão nas placas de 96 poços, o meio DMEN 10% foi retirado e substituído por DMEN 3% contendo PAMAAlClPc, PAMCurcumina, PAMAAlClPc+Curcumina, e os fármacos livres, permanecendo em incubação por 3 h em 37°C e 5% CO₂. Para avaliar a fototoxicidade de AlClPc livre e curcumina livre foram as mesmas foram diluídas em uma solução estoque (DMSO) em meio DMEN 10%, sendo que a diluição foi feita de forma que a concentração final de DMSO no meio de cultura nunca excedesse 0,3% (v/v), evitando assim, citotoxicidade induzida pelo solvente orgânico. Após 3 h, o meio foi retirado e substituído por DMEN sem vermelho de fenol para a aplicação da luz laser. Deste modo, as células foram irradiadas usando o sistema laser Nd-YAG modelo Brilliant B (QuantumTech), acoplado ao sistema OPO Rainbow Quantel com faixa de comprimento de ondas ajustáveis de 410 a 970 nm (Quantel Laser, França), com feixe de excitação centrado em 675 nm, energia do laser em 20 mW, e frequência em 2 Hz, com doses de luz ajustados em 70, 200, 500 e 700 mJ cm⁻² para a AlClPc. Para a curcumina o feixe de excitação foi ajustado em 418 nm, energia do laser em 45 mW, e frequência em 2 Hz, com doses de luz de 500, 1000, 1500 e 2000 mJ cm⁻². Para a calibração da potencia (W/cm²) e energia (J/cm²) do laser foi utilizado o detector do modelo *FieldMAXII-TOP Coherent* (Portland, U.S.A.), que abrange toda o comprimento de onda da faixa do visível (350-750nm). Posteriormente, foi o meio DMEN sem fenol foi substituído por DMEN 10%, e as células foram novamente incubadas por 24 h (37°C e 5% CO₂). Em seguida foi realizado o ensaio de viabilidade celular padrão MTT como descrito na seção 3.8.4. Neste experimento o controle foi estabelecido com poços contendo: (i)

células sem fármaco fotossensibilizante e não irradiadas, (ii) células sem fármaco fotossensibilizante irradiadas, (iii) células contendo PAMVazia, (iv) células contendo DMSO 0,5% (v/v) não irradiado. Os resultados obtidos foram valores médios da viabilidade celular $\pm$ erro padrão médio (EPM) de experimentos em triplicata.

Figura 10. Sistema de irradiação laser Nd-YAG acoplado do OPO-rainbow da Quantel Laser, utilizado nos estudos de fotoestimulação.

3.8.3.1 – Ensaios *in vitro* de fotocitotoxicidade da AlClPc comparando o laser com energia contínua e o laser com energia pulsada

Este estudo foi feito com o objetivo de compararmos os resultados obtidos quando irradiamos as células com o diodo-laser Eagle 2W-630 nm (Quantum Tech, São Carlos, SP, Brasil), que consiste num laser contínuo, com luz monocromática a 675 nm, e o laser Brilliant b com sistema OPO Rainbow, que consiste num laser pulsado. O laser pulsado entrega uma quantidade de energia por pulso, e o laser contínuo entrega uma quantidade de energia por unidade de tempo. A figura 11 apresenta os dois diferentes tipos de laser utilizados.

(A)

(B)

Figura 11. Sistema de irradiação com laser Nd-YAG acoplado ao sistema OPO *rainbow* para excitação em 670 nm (A) e sistema laser de diodo modelo *Eagle* com fibra-óptica difusa para excitação em 670 nm (B), ambos utilizados nos estudos de fotoestimulação.

Neste ensaio foi utilizado a PAMAlCIPc de concentração 3uM, e o experimento foi conduzido conforme já descrito no item 3.8.3. Para esse experimento, foi utilizado o mesmo lote de células da linhagem U87MG, e essas foram irradiadas com as mesmas doses de luz para os dois sistemas laser distintos (70, 200, 500, e 700 mJ cm⁻²), com excitação em 675 nm e potencia 20 mW para o laser *Eagle* e *Brilliant* b. Após a incubação das células, o meio DMEM sem fenol e substituído por DMEM 10%, e as células foram novamente incubadas por 24 h (37°C e 5% CO₂). Em seguida foi realizado o ensaio de viabilidade celular padrão MTT como descrito na seção 3.8.4. Neste experimento o controle foi estabelecido com poços contendo células sem fotossensibilizante e não irradiadas. Os resultados obtidos foram valores médios da viabilidade celular $\pm$ erro padrão médio (EPM) de experimentos em triplicata. Esse experimento foi feito com dois diferentes tempos de irradiação entre um laser e outro (3 horas e 6 horas), com o objetivo de avaliar qual o intervalo que potencializa o efeito fotodinâmico buscando morte celular.

3.8.3.2 – Ensaios *in vitro* de fototoxicidade em diferentes tempos de irradiação

Nos ensaios *in vitro* de fotocitotoxicidade foi utilizada AlCIPc 3 uM e curcumina 10 uM, como estabelecida no ensaio de citotoxicidade na seção 3.8.2. Este

estudo foi realizado com dois diferentes tempos de irradiação entre a aplicação do laser com feixe de excitação em 418 nm com dose de luz de 2000 mJ cm⁻² (curcumina), e do laser com feixe de excitação em 675 nm com dose de luz de 500 mJ cm⁻² (ftalocianina), com objetivo de potencializar o efeito de morte celular da linhagem de glioblastoma humano (U87MG) utilizando a formulação com os fármacos associados (PAMAlClPc+Curcumina). Deste modo, as células foram irradiadas no laser Brilliant b com intervalos de 3h e 6h entre uma irradiação e outra.

Este experimento foi conduzido conforme descrito no item 3.8.3. O laser Brilliant b foi calibrado utilizando o radiômetro modelo *FieldMAXII-TOP Coherent*, para que a dose de luz com feixe de excitação em 670 nm (AlClPc) seja de 500 mJ cm⁻² (laser vermelho), e dose de luz com feixe de excitação em 418 nm (curcumina) em 2000 mJ cm⁻² (laser âmbar). As células foram irradiadas em intervalos de tempo entre 3h e 6h, sendo aplicado primeiramente a luz laser vermelha (AlClPc) com dose de luz em 500 mJ cm⁻², e posteriormente a luz laser âmbar (curcumina) com dose de luz em 2000 mJ cm⁻², e vice-versa, conforme descrito na tabela 1. Posteriormente, foi retirado o meio DMEM sem fenol e substituído por DMEM 10%, e as células foram novamente incubadas por 24 h (37°C e 5% CO₂). Em seguida foi realizado o ensaio de viabilidade celular padrão MTT como descrito na seção 3.8.4. Neste experimento o controle foi estabelecido com poços contendo: (i) células sem fármaco fotossensibilizante e não irradiadas, (ii) PAMAlClPc+Curcumina com aplicação da luz laser com feixe de excitação em 675 nm com dose de luz somente em 500 mJ cm⁻², (iii) PAMAlClPc+Curcumina com aplicação da luz laser com feixe de excitação em 418 nm com dose de luz somente em 2000 mJ cm⁻², (iv) PAMAlClPc com aplicação da luz laser com feixe de excitação em 418 nm com dose de luz somente em 2000 mJ cm⁻², e (v) PAMCurcumina com aplicação da luz laser com feixe de excitação em 675 nm com dose de luz somente em 500 mJ cm⁻². Os resultados obtidos foram valores médios da viabilidade celular ± erro padrão médio (EPM) de experimentos em triplicata. A tabela abaixo apresenta os parâmetros do ensaio.

Tabela 1. Ensaios *in vitro* de fotocitotoxicidade (A e B) da PAMAlClPc+Curcumina no tempo zero, com intervalo de irradiação de 3 horas (I) e de 6 horas (II), alternando a aplicação do laser com feixe de excitação em 675 nm (AlClPc) com dose de luz em 500 mJ cm⁻² e do laser com feixe de excitação em 418 nm (curcumina) com dose de luz em 2000 mJ cm⁻².

Tempo Zero		I		II	
t=0		t=0	t=3h	t=0	t=6h
A	675 nm	675 nm	418 nm	675 nm	418 nm
	500 mJcm ⁻²	500 mJcm ⁻²	2000 mJcm ⁻²	500 mJcm ⁻²	2000 mJcm ⁻²
B	418 nm	418 nm	675 nm	418 nm	675 nm
	2000 mJcm ⁻²	2000 mJcm ⁻²	500 mJcm ⁻²	2000 mJcm ⁻²	500 mJcm ⁻²

3.8.4 – Ensaio de viabilidade celular (MTT)

Os ensaios *in vitro* de citotoxicidade na ausência e na presença de luz foram realizados conforme protocolos descritos por Denizot e Lang, e Twentyman e Luscombe (DENIZOT e LANG, 1986; TWENTYMAN e LUSCOMBE, 1987), no qual consiste no monitoramento da atividade mitocondrial das células viáveis, que são capazes de converter o sal tetrazólio MTT em um produto de coloração roxa (formazan), o qual é insolúvel em meio aquoso. Para isso, após 24h do tratamento das células com as formulações, foram adicionados 200µL de solução de MTT 15% em cada poço. As células foram incubadas por 4h, foi retirado o meio e substituído por 200µL de 2-propanol para solubilizar o produto formazan obtido.

As leituras espectrofotométricas do formazan foram realizadas em 570 e 690 nm no leitor de microplacas modelo Safire² (TECAN Group Ltd.). Foi feito o controle negativo, onde se utilizou um conjunto de 16 poços contendo as células sem adição da formulação, e o controle positivo, o qual consiste em células com a formulação vazia (PAM Vazia). Os resultados obtidos foram valores médios da viabilidade celular ± erro padrão médio (EPM) de experimentos em triplicata. Os resultados foram calculados segundo a equação 5:

$$\text{Células viáveis (\%)} = (\text{Absorbância amostra} / \text{Absorbância controle}) \times 100 \quad (5)$$

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando ANOVA seguido pelo teste de *Tukey* para múltiplas comparações. Todos os dados foram expressos como a média $\pm$ EMP de três experiências independentes. A probabilidade de $p < 0,05$ foi considerada significativa neste estudo.

3.9 - Microscopia Confocal

As células U87MG foram cultivadas em frascos de cultura de célula a 37 °C, com 5% de CO₂, até que estivessem confluentes. Para as experiências de localização subcelular, $1,5 \cdot 10^4$ células foram plaqueadas em uma placa de 24 poços sob lamínulas de vidro (13 mm). As células permaneceram em cultura durante 24 h, a 37°C, sob 5% de CO₂. Em seguida, foram tratadas em meio DMEM 3% com PAMAlCIPc 3 uM, PAMCurcumina 10 uM e PAMAlCIPc+Curcumina, na concentração de 3 uM e 10 uM, respectivamente, incubados pelo período de 3 h. Foram feitos controle sem formulação. Após o tratamento, o meio de cultura de cada poço foi retirado, e as células foram lavadas duas vezes com PBS (1X) e fixadas com uma solução de paraformaldeído a 4% diluído em tampão PBS (1X), durante 20 minutos e em temperatura ambiente. Posteriormente, as células foram lavadas duas vezes com PBS (1X) e incubadas por 5 minutos com uma solução comercial de glicina 100 mM (Sigma). As células foram lavadas duas vezes com PBS (1X) e permeabilizadas com Triton X-100 a 0,1% (Sigma) diluída em PBS (1X) durante 7 minutos à temperatura ambiente. As células foram então lavadas duas vezes com PBS (1X) e incubadas com o marcador Alexa Fluor 488 Faloidina (*Life Technologies*) na diluição de 1:20 em PBS (1X) durante 15 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas duas vezes com PBS (1X), e montada em lâminas de vidro, utilizando o reagente ProLong® ouro *antifade* (*Life Technologies*) especial para montagem de lâminas, contendo o marcador DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindole). As lâminas foram observadas no microscópio confocal modelo TCS-SP5 utilizando-se o sistema laser para excitação (Leica Microsystems, Mannheim, Alemanha). Foram utilizando o conjunto de emissão/excitação (675/610 nm) para detectar o sinal de fluorescência da AlCIPc internalizada; sendo a curcumina detectada em (520/570 nm);

o marcador de citoesqueleto Faloidina foi detectada em 518/495 nm; e o fluorocromo nuclear DAPI foi detectado em 460/360 nm.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 - Nanopartícula de Albumina pelo *Crosslinking* Térmico

Nanopartículas de albumina são biodegradáveis, fáceis de preparar e reprodutíveis. A albumina é normalmente transformada em nanopartículas através de sua desnaturação e formação de ligações cruzadas, e neste estudo, o aquecimento foi utilizado como o agente de *crosslinking*. A formação de ligações cruzadas descreve a formação de ligações covalentes (ELZOGHBY, SAMY e ELGINDY, 2012; LIU et al., 2009; WEBER et al., 2000). A PAMT obtida apresentou um estado sólido e coloração acinzentada, na ausência do fármaco, e azulada quando a mesma incorporava o fotossensibilizador (AICIPc). A quantidade, em massa, de cada formulação foi de aproximadamente 200 mg.

Para a caracterização da PAMT, o tamanho da partícula, IPd e potencial zeta foram analisados através da espectroscopia de correlação de fótons utilizando um Zetasizer® (XU, 2008) e os resultados dos 3 lotes de formulação vazia (PAMT Vazia) e 3 lotes de formulação com o fármaco (PAMT AICIPc) estão apresentados na tabela 2. Todas as amostras foram analisadas em triplicata, e a tabela 2 fornece a média das mesmas com os respectivos desvios padrão (DP).

Tabela 2. Resultado da caracterização de diferentes lotes de formulação vazia e contendo o fármaco AICIPc.

Formulações	Diâmetro Médio (nm)*	IPd*	Potencial Zeta (mV)*
PAMT Vazia 1	342,0 (±5,29)	0,51 (±0,010)	-40 (±0,17)
PAMT Vazia 2	362,1 (±9,15)	0,55 (±0,028)	-31 (±0,93)
PAMT Vazia 3	349,9 (±11,51)	0,47 (±0,015)	-41 (±1,0)
PAMT AICIPc 1	390,6 (±10,00)	0,44 (±0,011)	-32 (±1,2)
PAMT AICIPc 2	318,6 (±13,89)	0,51 (±0,010)	-33 (±2,1)
PAMT AICIPc 3	386,7 (±10,00)	0,55 (±0,013)	-25 (±1,8)

*Média ± Desvio Padrão; n = 3

Como pode ser observado na tabela 2, o tamanho de partículas das formulações desenvolvidas, na ausência e presença de fotossensibilizador, variou de 318,6 a 390,6 nm e o IPd entre 0,44 a 0,55, para médias obtidas a partir da curva de correlação por intensidade de luz espalhada. O tamanho de partícula médio está de acordo com o esperado (<500nm), pois se trata de uma nanopartícula proteica (ALKILANY et al., 2012), e o IPd médio é menor que 0,5, o que significa que a formulação obtida é parcialmente homogênea em suspensão. Todas as cargas de superfícies foram predominantemente negativas e variaram entre -41 a -25 mV, e isto se deve ao fato de que a molécula de albumina utilizada é carregada negativamente. Este valor do potencial indica também que as nanopartículas são estáveis do ponto de vista de equilíbrio eletrostático, pois quanto maior o valor em modulo do mesmo, maior é a repulsão entre elas, e consequentemente menor é a agregação, aumentando a estabilidade do sistema (ROLAND et al., 2003a; XU, 2008).

4.2 - Nanopartícula de Albumina obtida pelo *Crosslinking* Químico

A preparação da nanopartícula de albumina (PAMQ) utilizando o glutaraldeído como agente de *crosslinking* é um método simples, bem estabelecido e muito utilizado para a síntese de nanopartículas protéicas (LANGER et al., 2003; LANGER et al., 2008; PERALTA et al., 2013). As nanopartículas obtidas por esse método oferece várias vantagens para ser utilizado como nanocarreador, pois utiliza reagentes de baixa toxicidade e biocompatíveis. O polímero sintético ácido poli-láctico glicólico (PLGA) é amplamente utilizado para a preparação de nanopartículas poliméricas, e de acordo com a literatura a molécula de albumina (HSA) pode se adsorver no polímero devido a interações hidrofóbicas (SIQUEIRA-MOURA et al., 2013; TABATA e IKADA, 1988).

Para caracterização da PAM obtida pelo *crosslinking* químico, o tamanho da partícula, IPd e o potencial zeta foram analisados através da espectroscopia de correlação de fótons utilizando um Zetasizer® e os resultados dos lotes de formulação vazia (PAMQ Vazia), e contendo os fotossensibilizadores AlClPc (PAMQ AlClPc), curcumina (PAMQ Curcumina), e os fotossensibilizadores AlClPc e curcumina associados (PAMQAlClPc_Curcumina) estão apresentados na tabela 3. Todas as amostras foram analisadas em triplicata, e a tabela abaixo fornece a média das mesmas com os respectivos desvios padrão (DP).

Tabela 3. Resultado da caracterização das formulações da PAMQ Vazia e com os fotossensibilizadores AlClPc e curcumina.

Formulações	Diâmetro Médio (nm)*	IPd*	Potencial Zeta*
PAMQ Vazia 1	208,9 ($\pm 1,09$)	0,33 ($\pm 0,0057$)	-21 ($\pm 0,57$)
PAMQ Vazia 1	224,7 ($\pm 1,15$)	0,35 ($\pm 0,015$)	-17 ($\pm 0,60$)
PAMQ AlClPc 1	233,5 ($\pm 2,08$)	0,31 ($\pm 0,011$)	-20 ($\pm 1,60$)
PAMQ AlClPc 2	221,1 ($\pm 2,09$)	0,35 ($\pm 0,020$)	-17 ($\pm 1,52$)
PAMQ Curcumina 1	216,2 ($\pm 2,65$)	0,39 ($\pm 0,021$)	-19 ($\pm 1,15$)
PAMQ Curcumina 2	235,5 ($\pm 2,34$)	0,35 ($\pm 0,017$)	-20 ($\pm 0,57$)
PAMQ AlClPc+Curcumina 1	479,3 ($\pm 1,01$)	0,45 ($\pm 0,0057$)	-24 ($\pm 0,98$)
PAMQ AlClPc+Curcumina 2	437,9 ($\pm 4,04$)	0,55 ($\pm 0,013$)	-28 ($\pm 0,76$)

*Média $\pm$ Desvio Padrão

Como pode ser observado na tabela 3, as formulações (exceto para PAMQAlClPc+Curcumina) apresentaram diâmetro médio entre 208,9 a 235,5 nm e IPd entre 0,31 a 0,39 sendo um resultado satisfatório dentro do esperado para nanopartículas de albumina obtidas através do método de dessolvatação (LANGER et al., 2003). A PAMQAlClPc+Curcumina, por outro lado, apresentou um valor de diâmetro médio acima das outras (479,3 nm e 437,9 nm respectivamente), porém, dentro do esperado para nanopartículas poliméricas (200-500nm), de acordo com a literatura (ALKILANY et al., 2012). Esse aumento do tamanho da partícula pode ser explicado pelo fato de que foram adicionados dois fotossensibilizadores na formulação, podendo assim, ter contribuído para a formação de aglomerados na fase orgânica. Com relação ao potencial zeta, todas as cargas da superfície foram negativas, variando entre -29 a -17 mV. Os valores da carga de superfície estão de acordo com a literatura, e os fatores que mais contribuem para a carga negativa são a molécula de albumina e o óleo de soja (ROLAND et al., 2003a; XU, 2008; TEIXEIRA et al., 2005).

4.3 – Caracterização Físico Química das Nanopartículas

4.3.1- Estudo de estabilidade das formulações PAMT e PAMQ

O tamanho médio, potencial zeta e o índice de polidispersidade (IPd) são utilizados como indicadores de estabilidade desses sistemas nanoparticulados, e esses parâmetros foram avaliados durante 3 meses (90 dias) (PEREIRA et al., 2008). Os resultados obtidos para as formulações obtidas pelo *crosslinking* térmico (PAMT) e pelo *crosslinking* químico (PAMQ) estão apresentados na figura abaixo.

1 - Tamanho de Partícula

2 - Índice de Polidispersidade (IPd)

3 - Potencial Zeta

Figura 12. Caracterização das formulações em 0, 30, 60, 90: (1) tamanho médio ($\pm$ DP, colunas), (2) índice de polidispersidade ($\pm$ DP, colunas), e (3) potencial zeta ($\pm$ DP, colunas) das formulações de PAMT, vazia e com AlClPc (A), e PAMQ, vazia e com AlClPc (B), respectivamente.

As figuras acima demonstram o estudo de estabilidade físico-química das formulações de PAMT e PAMQ realizados no aparelho ZetaSizer® a 25°C. Como pode ser observado, houve um aumento significativo do tamanho médio e IPd da formulação de PAMT, identificado após 2 meses de armazenamento. O diâmetro médio da nanopartícula aumentou em aproximadamente 50%, variando-se de 380 nm para 630 nm, para a PAMT vazia; e 378 nm para 770 nm para a PAMT contendo a AlClPc. O IPd também apresentou um aumento em função do tempo, variando-se de 0,40 para 0,61 para a PAMT Vazia e de 0,44 a 0,75 para a PAMT contendo a AlClPc, demonstrando uma tendência a instabilidade físico-química após 60 dias. Esse aumento no diâmetro médio e no PDI indica uma provável formação de aglomerados, que podem influenciar diretamente e resultar na diminuição da estabilidade dos nanomateriais. Avaliando-se os resultados para a PAMQ, observa-se que não houve mudanças significativas ($p < 0,05$) em seus diâmetros médios e IPd, sendo possível concluir que durante o período analisado a formulação se manteve estável e homogênea ($IPd < 0,4$). O potencial zeta das formulações de PAMQ e PAMT não apresentou mudanças significativas, ficando em torno de -25,0 mV. Esses resultados para a PAMQ corroboram com o descrito na literatura, pois essas nanopartículas são estáveis ao longo tempo, apresentando diâmetro médio e IPd desejáveis (PEREIRA et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2005; WEBER et al., 2000; ANTON, BENOIT e SAULNIER, 2008).

Deste modo, optou-se por incorporar a curcumina e associar os dois fotossensibilizadores (AlClPc e curcumina) apenas na PAMQ. A estabilidade dessas formulações foram avaliadas durante 5 meses (150 dias), em armazenamento a 4°C, e os resultados obtidos estão apresentados na figura 13.

(A) Tamanho da partícula (nm)

(B) Índice de polidispersidade

(C) Potencial Zeta

Figura 13. Caracterização das formulações em 0, 30, 60, 90, 120 e 150 dias: (A) tamanho médio ($\pm$ DP, colunas), (B) índice de polidispersidade ($\pm$ DP, colunas), e (C) potencial zeta ($\pm$ DP, colunas) das formulações.

Como pode ser observado, o tamanho médio e IPd da PAMQvazia, PAMAICIPc e PAMcurcumina tiveram variações pequenas entre si durante 5 meses, variando entre 208 nm a 344 nm, e o IPd entre 0,30 de 0,44, confirmando a obtenção de nanopartículas protéicas homogêneas e estáveis. Na nanopartícula contendo os fotossensibilizadores associados, PAMAICIPc+Curcumina, apresentou tamanho médio acima das outras, porém se manteve estável dentro do período analisado, variando de 436,1 nm a 470,0 nm, para o diâmetro médio, e 0,45 a 0,51, para o IPd, indicando que a associação combinado dos fármacos não ocasiona uma instabilidade significado nas propriedades físico-químicas deste nanomaterial. Esse aumento do tamanho médio observado se deve ao fato de que foi adicionado mais um fotossensibilizador no núcleo oleoso da nanopartícula, contribuindo para o aumento do diâmetro do nanomaterial. Já o potencial zeta das formulações não apresentou mudanças significativas, variando de -18,0 mV a -30 mV. Como já mencionado acima estes resultados estão dentro do esperado de acordo com a literatura, com tamanho de partícula entre 200 – 500 nm, IPd menor que 0,5 e potencial zeta em torno de -30 mV. E ainda, esses resultados foram confirmados pelo teste de estabilidade acelerada (PEREIRA et al., 2008; ROLAND et al., 2003b; TEIXEIRA et al., 2005; ANTON , BENOIT e SAULNIER, 2008).

4.3.2 – Estudos de Microscopia de Força Atômica (MFA)

Microscopia de força atômica é uma técnica que permite fazer o rastreamento da superfície das partículas sem manipulação da amostra, fornecendo imagens bidimensionais e tridimensionais com resolução nanométrica. Para obtenção das imagens topográficas, a amostra fica em contato intermitente com cantilever de 124 μm de comprimento. Através desta técnica foi possível caracterizar simultaneamente a forma e estrutura da nanopartícula (PEREIRA et al., 2008; PREETZ et al., 2010) (GOTO et al., 2013).

A figura abaixo apresenta as estruturas bidimensionais e tridimensionais das nanopartículas vazias (A), de AlClPc (B), curcumina (C) e AlClPc+curcumina(D), respectivamente.

(A)

(B)

(C)

(D)

Figura 14. Fotomicrografias bidimensionais e tridimensionais, respectivamente, obtidas das formulações (A) PAMQVazia, (B) PAMQAlCIPc, (C) PAMQCurcumina, e (D) PAMQAlCIPc+Curcumina por microscopia de força atômica.

Pela análise bidimensional e tridimensional, mostrada na figura acima, foi possível observar que as nanopartículas apresentam formato predominantemente esférico, e composição heterogênea. A PAMQAlCIPc e PAMQCurcumina apresenta duas fases distintas, caracterizando uma diferença na composição da nanopartícula de albumina. Já a PAMQAlCIPc+Curcumina apresenta três fases distintas, podendo deduzir que são devido a presença de dois fotossensibilizadores. Deste modo, pode-se concluir que as nanopartículas de albumina possuem composição mista.

Os diâmetros médios obtidos pelas análises do perfil topográfico das formulações são apresentados na figura 15. Como é possível observar pela figura, os valores são próximos daqueles obtidos por espectroscopia de correlação de fótons, apresentado na seção 4.2. Deste modo, a microscopia de força atômica confirmou os resultados já obtidos, e os valores aproximados obtidos para a PAMVazia, PAMAAlCIPc, PAMCurcumina e PAMAAlCIPc+Curcumina são 190 nm, 290 nm, 272 nm, e 425 nm, respectivamente.

(A)

(B)

(C)

(D)

Figura 15. Fotomicrografia bidimensional e perfil topográfico dada pela análise do *software* mostrando medições do diâmetro e altura das nanopartículas: (A) Vazia, B) AlClPc, (C) Curcumina, e (D) AlClPc+Curcumina.

4.4 – Estabilidade Acelerada das Formulações

O ensaio de estabilidade de longa duração é um importante teste para avaliar o produto farmacêutico, pois irá definir algumas características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas do mesmo, que pode ajudar na interpretação e entendimento do tempo de prateleira relativo a validade. Deste modo, é possível observar eventuais características de instabilidade como separação, floculação e sedimentação, em até aproximadamente 2300 vezes mais rápido do que nos testes convencionais. A estabilidade pode ser definida como o momento entre a fabricação de um produto até aquele em que a atividade farmacológica não foi reduzida a um valor inferior a 10%. Utilizando a centrifuga analítica LUMiSizer® é possível determinar a estabilidade acelerada e determinar o tempo de prateleira (*shelf life*) de produtos como suspensões e emulsões. O LUMiSizer® permite medir a intensidade da transmitância da luz em função do tempo e posição sobre toda a amostra acondicionado na cubeta padrão da centrifuga simultaneamente (CHIU et al., 2012; PETZOLD et al., 2009).

As informações quantitativas são obtidas através da integração dos perfis de transmissão, onde a inclinação desse gráfico é diretamente relacionada a estabilidade da

formulação. A inclinação zero significa que não há mudança da concentração das partículas ao longo do tempo, ou seja, a formulação se manteve estável durante todo o tempo. Deste modo, quanto maior for a inclinação da reta, mais instável é a amostra, e o processo de instabilidade é acompanhado pelas mudanças nos perfis causados por floculação, sedimentação, cremosidade ou coalescência (DETLOFF, SOBISCH e LERCHE, 2007; LERCHE e SOBISCH, 2014; SOBISCH e LERCHE, 2008).

A figura 16 abaixo apresenta os perfis de transmissão das formulações ao longo de 1 ano, a 25°C, das formulações de PAMQ sem incorporação de fármaco, com AlClPc, com curcumina e com a associação dos fármacos AlClPc e curcumina. Como pode ser observado, a amostra PAMVazia apresenta menor estabilidade no mesmo período de tempo que as outras nanopartículas, pois a diferença entre o primeiro perfil (vermelho) e o último perfil (verde) de transmissão é grande, indicando instabilidade. Nota-se que os perfis de transmissão da formulação PAMAAlClPc+Curcumina estão muito próximos, indicando maior estabilidade deste produto. Portanto, a ordem crescente de estabilidade das formulações ao longo do tempo analisado é: PAMVazia < PAMCurcumina < PAMAAlClPc < PAMAAlClPc+Curcumina.

(A)

(B)

(C)

(D)

Figura 16. Evolução dos perfis de transmissão das formulações (A) PAMVazia, (B)PAMAICIPc, (C)PAMCurcumina e (D)PAMAICIPc+Curcumina, centrifugadas a 3000 rpm por 4,4 h, a 25°C. Primeiro registro inferior, último perfis superior direito. A abscissa mostra a posição (nm) e a ordenada à transmissão de luz.

A figura 17 apresenta os gráficos das integrais da inclinação, pelos dados de inclinação (% de instabilidade por hora) obtidos na tabela 4. Notou-se que a formulação com os fotossensibilizadores AICIPc e curcumina associados apresentam menor inclinação, fazendo com que o coeficiente angular da reta se aproximasse de zero e portanto, maior estabilidade ao longo de 1 ano. A tabela 4 mostra a taxa de separação representada pela inclinação, e como pode ser observado, as nanopartículas vazia, com AICIPc, e com curcumina apresentam taxa de inclinação de aproximadamente 3%/hora e as nanopartículas com os fotossensibilizadores associados apresentaram taxa de inclinação de aproximadamente 1%/hora. Assim, durante 1 ano, é possível prever cerca de 13% de instabilidade das formulações vazias, AICIPc e curcumina, e cerca de 5% das formulações com os ativos associados, pois o tempo total do ensaio foi de 4,4h. Considerando que uma formulação é estável quando apresenta até 10% de instabilidade, o tempo de vida de prateleira é de aproximadamente 9 meses para as formulações vazia, AICIPc e curcumina, e de aproximadamente 1 ano para a formulação PAMAICIPc+Curcumina. Desse modo, pode-se dizer que quando associa-se os fármacos fotossensibilizadores, a formulação se torna mais estável ao longo do tempo. Isso pode ser explicado devido ao fato dos fármacos possuírem estruturas e

propriedades químicas diferentes, e, portanto não há competição pelo mesmo ambiente químico entre eles, e sim uma interação benéfica, ocasionando melhor estruturação da nanopartícula de albumina.

Figura 17. Integral da Transmissão na dependência de tempo para as formulações PAMVazia, PAMAIClPc, PAMCurcumina, PAMAIClPc+Curcumina, usando LUMiSizer1 a 3000 rpm e 4,4 h.

Tabela 4. Taxa de separação representada pela inclinação dos estudos de estabilidade

Amostras	Inclinação (%/hora)	Desvio Padrão (%/hora)	Coefficiente de Correlação	Força Relativa Centrífuga (RCF)
PAMVazia	3,0815	0,1365	0,8180	3000
PAMAIClPc	3,2719	0,0115	0,9985	3000
PAMCurcumina	3,1703	0,1588	0,7826	3000
PAMAIClPc+Curcumina	1,1890	0,0112	0,9890	3000

4.5 - Linearidade da Ftalocianina de Cloro Alumínio (AlClPc) e Curcumina

A linearidade de um método analítico é a capacidade de se obter resultados experimentais diretamente proporcionais a concentração do analito. Sendo assim, as

análises de regressão linear foram realizadas construindo um gráfico de absorbância ou intensidade de fluorescência versus concentração do fármaco fotossensibilizador em ug/mL.

O espectro de absorção da ftalocianina apresenta duas bandas principais, sendo uma na região do ultravioleta (300-350 nm), banda B (banda Soret), e a outra na região da luz visível (600-700 nm), banda Q (SIQUEIRA-MOURA et al., 2010; TEDESCO, ROTTA e LUNARDI, 2003). A ftalocianina de cloro alumínio em acetonitrila (figura 18) apresentou as bandas características (banda B e banda Q). O comprimento de onda de absorção máxima no espectrofotômetro de absorção UV-Vis foi de 674 nm, e no espectrofluorímetro o espectro foi obtido com comprimento de onda de excitação em 615 nm e máximo de emissão de fluorescência em 674 nm. A linearidade (absorbância ou intensidade de fluorescência versus concentração de ftalocianina em ug/mL) pode ser observada na figura 19.

Figura 18. Espectros de absorção UV-Vis (A) e de fluorescência (B), com excitação em 615 nm e máximo de emissão de fluorescência em 674 nm, aberturas de emissão e excitação ajustadas em 3 e 3 nm, respectivamente, de soluções de AlClPc em acetonitrila (concentrações: 0,5 a 3,0ug/mL para absorção e 0,05 a 1,0ug/mL para fluorescência).

Figura 19. Curva padrão de AIClPc em acetonitrila: (A) concentração (0,5 – 3 ug/mL) versus absorbância ($y = 0,3492x + 0,0248$; $r = 0,9999$) e (B) concentração (0,05 – 1,0 ug/mL) versus intensidade de fluorescência ($y = 3.10^6 + 386495$; $r = 0,9965$).

O espectro de absorção da curcumina apresenta uma banda principal na região do visível (400 - 430 nm). A curcumina em acetonitrila (figura 20) apresenta a absorção máxima 418 nm, e no espectrofluorímetro o espectro foi obtido com comprimento de onda de excitação em 430 nm e máximo de emissão de fluorescência em 539 nm. O resultado da linearidade (absorbância ou intensidade de fluorescência versus concentração de curcumina em ug/m) pode ser observado na figura 21.

Figura 20. Espectros de absorção UV-Vis (A) e de fluorescência (B), com excitação em 430 nm, máximo de emissão de fluorescência em 539 nm, e aberturas de emissão e excitação ajustadas em 3 e 3 nm, respectivamente, de soluções de curcumina em acetonitrila (concentrações: 0,2 a 5,0ug/mL para absorção e 0,1 a 2,0ug/mL para fluorescência).

Figura 21. Curva padrão de curcumina em acetonitrila: (A) concentração (0,2 – 5,0 ug/mL) versus absorbância ($y = 0,1753x + 0,0049$; $r = 1$) e (B) concentração (0,1 – 1,0 ug/mL) versus intensidade de fluorescência ($y = 3.10^6 + 29047$; $r = 0,9974$).

Portanto, a linearidade para o espectrofotômetro de absorção UV/Vis e espectrofluorímetro foi satisfatória, nos respectivos intervalos de concentração, pois ambos os coeficientes de correlação obtidos foram próximos da unidade ($r > 0,99$).

4.5.1 – Limites de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ)

O método espectroscópico para a quantificação do ativo AlClPc demonstrou ser sensível para a LD de $0,030 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e LQ de $0,085 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Já a curcumina mostrou ser sensível em LD de $0,082 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e LQ de $0,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

4.6 - Estudo de espectroscopia de absorção e emissão de fluorescência no UV-Vis e determinação da taxa de associação dos fotossensibilizadores incorporados a nanopartícula de albumina

O método de quantificação foi estabelecido conforme descrito no item 3.4.2. Os espectros de comprimento de onda (nm) vs. absorbância obtido por espectrofotometria de absorção no UV-Vis e os espectros de comprimento de onda (nm) vs. intensidade de fluorescência dos fotossensibilizadores associados à PAMT e PAMQ estão representados nas figuras 22 e 23, respectivamente.

Figura 22. Espectro de varredura da Ftalocianina de Cloro e Alumínio, em acetonitrila, incorporada na PAMT, por espectrofotômetro de absorção no UV/Vis (A) e emissão de fluorescência (B), com excitação

em 615 nm, máximo de emissão de fluorescência em 674 nm, e aberturas de emissão e excitação em 3 e 3 nm, respectivamente.

Figura 23. Espectro de varredura da Ftalocianina de Cloro e Alumínio, em acetonitrila, incorporada na PAMQ, por espectrofotômetro de absorção no UV/Vis e emissão de fluorescência, com excitação em 615 nm e máximo de emissão de fluorescência em 674 nm, aberturas de emissão e excitação ajustadas em 3 e 3 nm, respectivamente.

As propriedades espectroscópicas da AlClPc de absorção no UV-Vis e de emissão de fluorescência das formulações de PAMT e PAMQ mostraram os picos característicos de AlClPc com máximo em 674 nm, relativos ao conjunto característico de banda Q e com máximo em 338 nm relativo a presença da banda Soret na região de maior energia. Pela equação da reta obtida pela linearidade de AlClPc, apresentada no item 4.5, foi possível quantificar e determinar o rendimento do fármaco incorporado nas formulações, e os valores estão representados na tabela 5.

As figuras 24 e 25 apresentam os espectros de absorção no UV-Vis e emissão de fluorescência da PAMQ, com curcumina e com os fotossensibilizadores AlClPc e curcumina incorporados simultaneamente aos nanomateriais.

Figura 24. Espectro de varredura da curcumina, em acetonitrila, incorporada na PAMQ, por espectrofotômetro de absorção no UV/Vis e emissão de fluorescência, com excitação em 430 nm, máximo de emissão de fluorescência em 539 nm, e aberturas de emissão e excitação ajustadas em 3 e 3 nm, respectivamente.

Figura 25. Espectro de varredura dos fotossensibilizadores AIClPc e curcumina associados, em acetonitrila, incorporada na PAMQ, por espectrofotômetro de absorção UV/Vis (A) e fluorescência (B), respectivamente. Para a emissão de fluorescência de AIClPc, o comprimento de onda de excitação foi ajustado em 615 nm, máximo de emissão de fluorescência em 674 nm e aberturas de emissão e excitação em 3 e 3 nm, respectivamente; e para a emissão de fluorescência de curcumina, o comprimento de onda de excitação foi ajustado em 430 nm, máximo de emissão de fluorescência em 538 nm e aberturas de emissão e excitação em 3 e 3 nm.

De acordo com a figura 24, pode-se observar que os espectros de absorção no UV-Vis e de emissão de fluorescência da curcumina mostraram o pico característico da mesma, com comprimento de onda máximo em 418 nm e 539 nm, respectivamente. Também foram obtidos os picos característicos dos fármacos AIClPc e curcumina incorporados simultaneamente (figura 25), com máximo em 674 nm, relativo ao

conjunto característico de bandas Q e com máximo em 350 nm, relativo apresenta da banca Soret na região de maior energia, para a AlClPc, e máximo em 420 nm para a curcumina. Assim, através dos estudos espectroscópicos, é possível concluir que as associações dos fármacos aos nanomateriais não alteram as suas respectivas propriedades fotofísicas e fotoquímicas no estado estacionário (UV-Vis). Deste modo, as formulações foram quantificadas, e as quantidades de ativo incorporados na nanocápsula estão apresentados na tabela 5.

Tabela 5. Quantificação dos fotossensibilizadores encapsulados nas formulações de PAMT e PAMQ.

	Concentração (uM)	Fármaco Incorporado (%)
PAMT AlClPc	0,020 ug AlClPc/mg PAM	2
PAMQ AlClPc	48,8	20
PAMQ Curcumina	101	43
PAMQ AlClPc + Curcumina	97 AlClPc	38 AlClPc
	162 curcumina	70 curcumina

Pela tabela, pode-se observar que a taxa de incorporação da PAMT é baixo, e isso pode ser explicado pelo fato de que a AlClPc é muito lipofílica, e durante a preparação da formulação, descrito no item 3.2, as nanopartículas são lavadas inúmeras vezes para a retirada do óleo e outros resíduos. Este processo de lavagem pode interferir na eficiência de encapsulação do fármaco na nanopartícula, e, portanto, reduzir o rendimento esperado. Já a PAMQ tem uma alta taxa de incorporação de fármaco, comparado com a PAMT, obtendo uma concentração final de AlClPc, curcumina e AlClPc+curcumina incorporados simultaneamente aos nanomateriais, satisfatória para os estudos posteriores (*in vitro*). Desta forma, a PAMQ foi escolhida para ser selecionada como o sistema de liberação mais adequado para os fármacos fotossensibilizadores. Assim como no estudo de estabilidade acelerada ao longo do tempo (item 4.4), a PAMAAlClPc+Curcumina resultou em um aumento na quantidade dos fármacos incorporados na formulação, e como descrito no item 4.4 os fármacos

possuem estruturas químicas diferentes, não havendo competição pela nanopartícula, e portanto favorecendo a internalização dos mesmos.

4.7 – Ensaios *in vitro* em cultura celular de linhagem de glioblastoma humano U87MG

4.7.1 – Micrografia celular

As imagens da linhagem celular de glioblastoma humano (U87MG) obtidas através de microscopia óptica de alta resolução é uma ferramenta importante para analisar e monitorar o crescimento das células, assim como suas características morfológicas, observar se houve contaminação do meio pela presença de bactérias, fungos, ou corpúsculos estranhos, e monitoração de morte celular. A figura abaixo apresenta o crescimento da linhagem U87MG, e suas principais características morfológicas.

Figura 26. Fotografias tiradas com um microscópio de contraste de fase da linhagem celular de glioblastoma humano (U87MG) na fase inicial de crescimento (A) e com conformação confluentes (B e C), incubadas com meio de cultura, sem irradiação ou tratamento com formulação. Lentes usadas com objetiva de 10x (A e B) e 20x (C).

Nas imagens, pode-se observar que as células são do tipo glial que apresentam formato ramificado, alongado, se assemelhando com células neuronais. Esta linhagem se adere em substrato sólido, e, portanto foi cultivada em garrafas de polipropileno estéreis, com meio de cultura DMEN suplementando com 10% de soro fetal bovino, 2 mmol.L⁻¹ de glutamina, 100 U.mL⁻¹ de penicilina, e 0.1 mg.mL⁻¹ de estreptomicina. Na figura 26A observa-se células de glioblastoma U87MG em fase de crescimento, com poucas células na garrafa, já a figura 26B e 26C apresenta células confluentes com conformação adequada para realização de ensaios *in vitro*.

4.7.2 – Ensaios *in vitro* de compatibilidade biológica (citotoxicidade)

A linhagem de glioblastoma U87MG utilizada neste ensaio foi cultivada conforme o item 3.8. Todo fármaco fotossensibilizador possui uma faixa de ação terapêutica, onde o mesmo não apresenta toxicidade. Deste modo, para avaliar a citotoxicidade das formulações na ausência de estímulo luminoso, as células foram tratadas com AlClPc livre e PAMQAlClPc (0,5; 1,0; 3,0 e 5,0 μ M), curcumina livre e PAMQCurcumina (5,0; 10,0; 15,0 e 20,0 μ M), com o objetivo de determinar a melhor dose resposta que não matariam as células na ausência de fotoativação e observar se a associação entre os fotossensibilizadores potencializam a morte celular.

Como pode ser observado na figura abaixo, após o tempo de incubação de 3 horas, não houve efeito tóxico significativo ($p>0,05$) das formulações para as células, na ausência do estímulo luminoso, para as concentrações de 0,5; 1,0; e 3,0 μ M de AlClPc, e 5,0; 10,0; e 15,0 μ M de curcumina. Deste modo, optou-se por utilizar as concentrações de 3,0 μ M AlClPc e 10 μ M de curcumina, para assegurar a viabilidade celular (BECHET et al., 2008; GUINEBRETIERE et al., 2002; MORA-HUERTAS, FESSI e ELAISSARI, 2009). Como controle foi utilizada a formulação vazia, ou seja, sem fotossensibilizador, e como pode ser observado pela figura 25, a mesma não apresenta efeito tóxico para a célula. O efeito tóxico da AlClPc e curcumina livre também foi estudada nas células nas mesmas condições experimentais realizadas para as formulações, e pode ser observado na figura 28.

Figura 27. Ensaio de citotoxicidade celular em linhagem de glioblastoma U87MG incubados durante 3 h com formulações de (A) PAMAlCIPc e (B) PAMCurcumina, sem ação de luz, as células foram incubadas nas seguintes concentrações de PAMAlCIPc 0,5; 1,0; 3,0 e 5,0 μM e PAMCurcumina 5,0; 10,0; 15,0 e 20,0 μM. Foi feita análise de variância One-Way ANOVA, seguida do pós-teste de Dunnett, considerando o nível de significância $p < 0,05$.

Figura 28. Ensaio de citotoxicidade celular em linhagem de glioblastoma U87MG incubados durante 3 h com formulações de (A) AlCIPc livre e (B) curcumina livre, sem ação de luz, e as células foram incubadas nas seguintes concentrações de AlCIPc 0,5; 1,0; 3,0 e 5,0 μM e curcumina 5,0; 10,0; 15,0; 20,0 μM. Foi feita análise de variância One-Way ANOVA, seguida do pós-teste de Dunnett, considerando o nível de significância $p < 0,05$.

Esses resultados estão de acordo com pesquisas anteriores, onde se espera que nanopartículas de albumina apresente baixo efeito tóxico e biocompatíveis com o tecido biológico e celular, sendo que os fotossensibilizadores utilizados apresentam baixo nível

de toxicidade na ausência de luz, o que satisfaz a condição para seleção de um FS ideal para a TFD (ZANOTTO-FILHO et al., 2013) (FANALI et al., 2012; KUFLEITNER et al., 2010; OGURA et al., 2006; RUBY et al., 1995; SEBAK et al., 2010; SHEN, JI e ZHANG, 2005). Com esses resultados, as concentrações de AlClPc e curcumina nanoencapsuladas de 3 μM e 10 μM , respectivamente, foram estabelecidas como “concentração de trabalho” para a realização de todos os ensaios de fototoxicidade uma vez que não foi encontrada citotoxicidade significativa ($p > 0,05$). Também foi avaliada a compatibilidade biológica da formulação com os fármacos combinados, na ausência do estímulo luminoso. Como é possível observar na figura abaixo, a mesma não apresenta toxicidade estatisticamente significativa para o modelo celular utilizado neste ensaio *in vitro*.

Figura 29. Ensaio de citotoxicidade celular em linhagem de glioblastoma U87MG incubados durante 3 h com as formulações PAMVazia, PAMAICIPc, PAMCurcumina e PAMAICIPc+Curcumina, sem ação de luz, e as células foram incubadas com 3,0 μM de PAMAICIPc, 10,0 μM de PAMCurcumina, 3,0 e 10,0 μM de PAMAICIPc+Curcumina, respectivamente. Foi feita análise de variância One-Way ANOVA, seguida do pós-teste de Dunnett, considerando o nível de significância $p < 0,05$.

4.7.2.1 – Ensaios *in vitro* para determinação do tempo de viabilidade celular adequado para as formulações contendo AlClPc e/ou Curcumina

Esse ensaio foi realizado com a finalidade de investigar e avaliar qual intervalo de incubação das células ocorre a melhor viabilidade celular dos fármacos fotossensibilizadores presentes na formulação, sem apresentar efeito tóxico significativo. Assim, as células foram tratadas com as formulações de PAMQ nas

concentrações de AlClPc e curcumina já estabelecidas no experimento de citotoxicidade (item 4.7.2). Como controle negativo foi utilizado somente células, e também nanopartícula de albumina sem fármaco inserido (PAMQVazia).

Deste modo, o experimento foi realizado em três diferentes tempos de incubação (3, 6 e 9 horas), e os resultados obtidos estão na figura 30.

Figura 30. Ensaio de internalização celular em linhagem de glioblastoma U87MG incubados durante 3h (A), 6h (B), e 9h (C), com as formulações PAMVazia, PAMAICIPc, PAMCurcumina e PAMAICIPc+Curcumina, sem ação de luz. As células foram incubadas com 3,0 μ M de PAMAICIPc, 10,0 μ M de PAMCurcumina, 3,0 e 10,0 μ M de PAMAICIPc+Curcumina. Foi feita análise de variância One-Way ANOVA, seguida do pós-teste de Dunnett, considerando o nível de significância $p < 0,05$.

Pela análise da figura 30, é possível observar que a viabilidade celular nos tempos de internalização de 3 horas e 6 horas apresentaram resultados semelhantes para todas as formulações, sem diferença significativa entre eles ($p < 0,05$), uma vez que as taxas de viabilidade para PAMQVazia, PAMQAICIPc, PAMQCurcumina, e PAMQAICIPc+Curcumina foram de aproximadamente 90, 85, 85, e 87% para internalização de 3 horas, e de aproximadamente 89, 84, 87, e 84% para internalização de 6 horas, respectivamente. Já para o intervalo de internalização de 9 horas, é possível observar que a viabilidade celular está abaixo de 80%, e, portanto, as formulações de PAMQ apresentaram efeito tóxico significativo ($p < 0,05$) para a célula. Com isso, pode-se analisar que em até 6 horas de incubação, as células estão viáveis, e as formulações não ocasiona efeitos tóxicos significativos para a linhagem estudada. Consequentemente, esse resultado obtido confirma o fato de que o melhor tempo de internalização é de 3 horas para o sistema utilizado.

4.7.3 – Ensaios *in vitro* de fototoxicidade

A terapia fotodinâmica é baseada na interação do fármaco fotossensibilizador com luz visível, na célula alvo, para a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e oxigênio molecular. Sendo assim, os principais fatores que afetam o efeito fototóxico na célula é a concentração do fármaco fotossensível, a dose de luz aplicada e o oxigênio presente no sistema (DOLMANS, FUKUMURA e JAIN, 2003) (GIGIO-BENATO, GEUNA e ROCHKIND, 2005; ZHANG et al., 2016).

Para os ensaios de fototoxicidade, as concentrações dos fármacos fotossensibilizadores AICIPc e curcumina foram estabelecidos no experimento de citotoxicidade, da seção 4.7.2. Como controles foram utilizadas células sem fármaco fotossensibilizadores e não irradiadas, células sem fármaco fotossensibilizadores irradiadas, células contendo DMSO 0,3% (v/v), e células incubadas com nanopartículas de albumina vazia. Deste modo, o dano celular foi avaliado aplicando doses de luz ajustadas em 70, 200, 500 e 700 mJ.cm^{-2} para a AICIPc, com excitação em 675 nm, energia do laser em 20 mW, e frequência em 2,0 Hz. Para a curcumina as doses de luz foram ajustadas em 500, 1000, 1500 e 2000 mJ.cm^{-2} , com excitação em 418 nm, energia do laser em 45 mW, e frequência em 2,0 Hz. A figura 31 abaixo apresenta os resultados

da viabilidade celular da linhagem de glioblastoma em função do aumento da dose de energia aplicada.

Figura 31. Ensaio de fototoxicidade usando o teste de viabilidade MTT após incubação com as formulações de PAMQAICIPc (C), AICIPc livre (D), PAMQCurcumina (E), e Curcumina livre (F) nas células U87MG e posterior irradiação com diferentes doses para a AICIPc (70, 200, 500, e 700 mJ cm⁻²), com feixe de excitação em 675 nm, e para a curcumina (500, 1000, 1500, e 2000 mJ cm⁻²), com feixe de excitação em 418 nm. Neste ensaio usou-se como controle negativo apenas com células (0 mJ.cm⁻²) e um controle do laser (A e B), ou seja, células e irradiação de todas as dosagens. Foi realizado a análise de variância One-Way ANOVA, seguida do pós-teste de Dunnett (**p* < 0,05 comparado ao controle de 100%).

Os resultados da figura acima mostram que o efeito de dano proporcionado pela fotoativação em ambiente celular, depende diretamente da relação da dose de energia por área, aplicada sob o modelo celular. Deste modo, observa-se uma diminuição gradativa da viabilidade celular em função do aumento da dose de energia aplicada. Como pode ser observado, a viabilidade celular foi menor para os sistemas em que se utilizou o nanocarreador para veiculação dos fármacos fotossensibilizador (31C e 31E), do que quando se utiliza a AlClPc e a curcumina livres (31D e 31F). A viabilidade celular da PAMQAlClPc e PAMQCurcumina foram 50, 43, 27, 22%; e 75, 74, 63, e 59%, respectivamente, já a AlClPc e a curcumina livre foram 77, 66, 61 e 53%; e 78, 70, 71, 66%, respectivamente, e deste modo o emprego da nanopartícula como sistema carreador colaboram para um aumento da atividade terapêutica, concordando com o já descrito na literatura (SHI et al., 2010). Células tratadas com PAMVazia, com DMSO 0,3% (v/v), e irradiadas com o laser não apresentaram diferença significativa em relação ao controle negativo ($p < 0,05$), mostrando que apenas a luz laser não provoca efeito tóxico na célula.

Pela análise da figura 31C (PAMQAlClPc), observa-se que com a aplicação da menor dose de energia, 70 mJ.cm^{-2} , já foi encontrada morte celular significativa em relação ao controle, ficando abaixo do LD50. Quando a PAMQAlClPc foi irradiada com doses de energia de 500 mJ.cm^{-2} e 700 mJ.cm^{-2} , obteve-se morte celular de 73 e 78%, respectivamente, apresentando um considerável efeito fototóxico na linhagem de glioblastoma. Já para a PAMQCurcumina (31E) não foi observada morte celular abaixo do LD50 mesmo na maior dose de energia (2000 mJ.cm^{-2}), porém esse resultado está dentro do esperado, de acordo com a literatura, pois a curcumina apresenta propriedades terapêuticas complementares como ação antioxidante e anti-inflamatória, o que descreve mecanismos adicionais de atuação biológica (KOON et al., 2006; SARKAR e HUSSAIN, 2016). Visando aumentar a atividade fototerapêutica da formulação, foi feito ensaios *in vitro* de fototoxicidade da associação dos dois fármacos fotossensibilizadores (PAMQAlClPc+Curcumina), nas mesmas concentrações (3 μM para a AlClPc e 10 μM para curcumina). Para esses ensaios, optou-se por utilizar a dose de energia de 500 mJ.cm^{-2} para a AlClPc, e dose de energia de 2000 mJ.cm^{-2} para a curcumina. A linhagem celular de glioblastoma foi então incubada com a nanopartícula contendo a associação dos fármacos, e irradiadas com o laser no feixe de excitação em 674 nm para a AlClPc e feixe de excitação em 418 nm para a curcumina. A viabilidade

celular foi determinada para cada condição em estudo, utilizando-se o teste de MTT, e correlacionado com o controle, conforme demonstra a figura 32.

Figura 32. Ensaio de fototoxicidade usando o teste de viabilidade MTT após incubação de 3 horas com a PAMQAIClPc+Curcumina, nas células U87MG e posterior irradiação dose de energia de 500 mJ cm⁻² para a AIClPc, com feixe de excitação em 675 nm, e dose de energia de 2000 mJ cm⁻² para a curcumina, com feixe de excitação em 418 nm. Neste ensaio usou-se como controle negativo apenas com células (0 mJ.cm⁻²). Foi realizada a análise de variância One-Way ANOVA, seguida do pós-teste de Dunnett (**p* < 0,05 comparado ao controle de 100%).

A figura mostra que, no tempo zero de irradiação entre os diferentes feixes de excitação dos fármacos fotossensibilizadores, a viabilidade celular foi semelhante para todas as variações de irradiação, não apresentado diferença significativa entre eles. Portanto, a associação dos dois fármacos provocou uma morte celular de aproximadamente 40% para a linhagem celular de glioblastoma humano. Desta forma, foi possível analisar que apesar de irradiar as células com dois feixes de excitação diferentes não obteve-se morte celular abaixo de LD50, e uma possível explicação para isso se deve ao fato da curcumina ter propriedades antioxidantes, interferindo assim, na formação de radicais livres que ocasionam a morte celular (MAHESHWARI et al., 2005; MIQUEL et al., 2002; SELVAM et al., 1995). (BISHT, WAGNER e BULMER, 2010).

4.7.3.1 – Ensaios *in vitro* de fototoxicidade em diferentes tempos de irradiação

Esse ensaio foi realizado com o propósito de potencializar o dano fotodinâmico na célula de glioblastoma humano, perante a formulação contendo os fármacos

associados, irradiando a mesma no tempo zero, ou seja, sem intervalo entre uma irradiação, e outra, e em intervalos de irradiação de 3 e 6 horas. O experimento foi conduzido conforme descrito nos ensaios de fototoxicidade da seção 4.7.3. A concentração dos fármacos fotossensibilizadores da formulação de PAMQ foi a mesma já descrita anteriormente, de 3 μM para AlCIPc, e 10 μM para a curcumina, e as doses de energia utilizadas para irradiação também foram as mesmas: 500 mJ cm^{-2} para a AlCIPc (feixe de excitação em 675 nm), e dose de energia de 2000 mJ cm^{-2} para a curcumina (feixe de excitação em 418 nm). As células foram irradiadas conforme a tabela 2 mostrada no item 3.8.3.2, em intervalos de 3 e 6 horas. A figura 33A apresenta os controles estabelecidos no item 3.8.3.2, e a figura 33B expõe os resultados da viabilidade celular da linhagem de glioblastoma em função das diferentes doses de energia aplicada em diferentes intervalos de irradiação.

Figura 33. Ensaio de fototoxicidade usando o teste de viabilidade MTT após incubação de 3 horas com a PAMQAlCIPc+Curcumina, nas células U87MG e posterior irradiação dose de energia de 500 mJ cm^{-2} para a AlCIPc, com feixe de excitação em 675 nm, e dose de energia de 2000 mJ cm^{-2} para a curcumina, com feixe de excitação em 418 nm. Figura A refere-se aos experimentos controle: (1) PAMQAlCIPc+Curcumina com aplicação de luz em 500 mJ cm^{-2} em 675 nm, (2) PAMQAlCIPc+Curcumina com aplicação de luz em 2000 mJ cm^{-2} em 418 nm, (3) PAMQAlCIPc com aplicação de luz em 2000 mJ cm^{-2} em 418 nm, e (4) PAMQCurcumina com aplicação de luz em 500 mJ cm^{-2} em 675 nm. A figura B refere-se ao experimento com diferentes tempos de irradiação. Foi realizada a análise de variância One-Way ANOVA, seguida do pós-teste de Dunnett (* $p < 0,05$ comparado ao controle de 100%).

A figura 33A estabelece a morte celular da formulação quando irradiadas com somente uma dose de luz (500 mJ cm^{-2} para a AlClPc ou 2000 mJ cm^{-2} para a curcumina). A viabilidade celular da PAMQAlClPc+Curcumina com aplicação da luz laser com feixe de excitação em 675 nm (1) e em 418 nm (2) foi de aproximadamente 51%, semelhante ao resultado mostrado na seção 4.7.3. Já quando se irradiou a formulação PAMQAlClPc com o comprimento de onda e dose de luz referente a curcumina, a formulação apresenta viabilidade celular de 84%, e quando irradiou-se a PAMCurcumina com comprimento de onda e dose de luz referente a AlClPc, a viabilidade celular foi de 92%. Esse resultado mostra que o efeito fotodinâmico significativo só é obtido quando se irradia o fármaco fotossensibilizante com o seu comprimento de onda específico devido a seletividade características para grupamentos cromóforos de compostos orgânicos que absorvem na região do UV-visível.

A figura 33B apresenta a viabilidade celular com diferentes tempos de irradiação entre o feixe de excitação da AlClPc (675 nm) e da curcumina (418 nm). Pode-se observar que a viabilidade celular no tempo zero (1 e 2) foi de aproximadamente 64%, semelhante ao resultado obtido na seção 4.7.3. Porém, observa-se que para o intervalo de irradiação de 3 horas (3 e 4) e 6 horas (5 e 6) a viabilidade celular é aproximadamente 30% e 22%, respectivamente, não havendo diferença significativa entre as colunas 3 e 4, e 5 e 6. Deste modo, os ensaios de fototoxicidade da PAMQAlClPc em diferentes tempos de irradiação provocou morte celular de 70% para intervalo de 3 horas, e 77% para intervalo de 6 horas, atingindo o LD50, e provocando o efeito fototóxico desejável *in vitro*, visando o tratamento fotodinâmico do sistema nervoso central. Esse resultado foi obtido, considerando que o modelo biológico celular utilizado no ensaio, pode ter sofrido um *stress* oxidativo no primeiro momento de irradiação, e posteriormente, a mesma é submetida à outro processo de irradiação consecutivo, e deste modo, o sistema biológico não conseguiu se restabelecer, ocasionando uma morte celular irreversível.

4.7.4 – Ensaios *in vitro* de fototoxicidade da AlClPc comparando o laser com energia contínua e o laser com energia pulsada

Laser (do inglês, *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*) é a amplificação da luz por emissão estimulada da radiação, e, portanto, é um dispositivo

que produz radiação eletromagnética, onde a fonte de luz é coerente, colimada e monocromática (ASSUNCAO e WILLIANS, 2013; BERETTA et al., 2007) (FIEDLER et al., 2000). Neste ensaio, foi realizado um estudo comparativo da resposta celular da fotoativação utilizando dois principais tipos de laser: contínuo e pulsante. No modo contínuo foi utilizado o laser Eagle 2W-630 nm, onde é emitido um raio constante de luz no sistema biológico. Já para o modo pulsado foi utilizado o laser Brilliant b acoplado ao sistema OPO Rainbow. A literatura apresenta diversos estudos que comparam a diferença e a eficiência do laser pulsado e do laser contínuo, sendo que em alguns estudos o laser de modo contínuo apresenta maior eficiência na TFD do que o laser no modo pulsado (KAWAUCHI et al., 2004; NAVAEIPOUR et al., 2016), enquanto em outros, a performance do laser pulsado é maior do que do laser contínuo na TFD (ESTEVEZ et al., 2010; XIAO et al., 2007). O laser pulsado pode permitir reoxigenação durante o período escuro, e teoricamente, há um aumento na formação de oxigênio singleto no sistema biológico. Existem ainda estudos que citam que a TFD utilizando luz pulsado induz a morte celular por apoptose, enquanto que a TFD utilizando luz contínua induz morte celular por necrose (KAWAUCHI et al., 2004; NAVAEIPOUR et al., 2016).

Para poder comparar diretamente os dois tipos de laser, os parâmetros de feixe de excitação, dose de luz, potência do laser, e diâmetro do feixe de luz foram ajustados para serem semelhantes nos dois sistemas. O experimento foi realizado no mesmo dia com os dois sistemas, com o mesmo lote da linhagem de U87MG (P28), e mesmo lote da formulação de AICIPc.

O experimento foi conduzido conforme já descrito na seção 4.7.3. A concentração de PAMQAICIPc utilizada foi de 3 μM , já estabelecida nos ensaios de citotoxicidade, e as doses de luz foram ajustados em 70, 200, 500 e 700 mJ cm^{-2} , com feixe de excitação em 675 nm, energia do laser em 20 Hz, e diâmetro do feixe de luz em 1,0 cm, para os dois sistemas de laser. Como controle foram utilizadas células sem fármaco fotossensibilizantes e não irradiadas (controle negativo), e células sem fármaco fotossensibilizador irradiadas com a maior dose de energia (700 mJ cm^{-2}). A figura 34 mostra os resultados da viabilidade celular da linhagem de glioblastoma no laser pulsado e no laser contínuo, em função do aumento da dose de energia aplicada.

Figura 34. Ensaio de fototoxicidade da PAMQAIClPc (3uM) em célula U87MG com diferentes doses de irradiação (70, 200, 500, e 700 mJ cm⁻²), com feixe de excitação em 675 nm, potencia do laser em 20 mW, no laser pulsado Brilliant b com sistema OPO Rainbow (A) e no laser contínuo Eagle 2W-630 nm (B). Neste ensaio usou-se como controle negativo apenas com células (0 mJ.cm⁻²) e um controle do laser (CT 700 mJ). Foi realizada a análise de variância One-Way ANOVA, seguida do pós-teste de Dunnett (**p* < 0,05 comparado ao controle de 100%).

Como é possível analisar pela figura 34, a viabilidade celular após a irradiação das células com os diferentes tipos de laser, pulsado (34A) e contínuo (34B), apresentou resultados semelhantes. Houve diferença significativa (*p* < 0,05) apenas para quando se aplicou a dose de luz em 200 mJ cm⁻², sendo que a luz contínua apresentou maior efeito de citotoxicidade no modelo biológico em estudo (31%). No laser pulsado, a viabilidade celular, em ordem crescente de energia, foi de, aproximadamente, 50%; 45%, 28,5%, e 25%. Já no laser contínuo, a viabilidade celular foi de, aproximadamente, 41%, 31%, 26%, e 21%. Diante disto, obteve-se um resultado comparativo entre os dois tipos de laser, e o laser contínuo apresentou um melhor resultado em relação ao laser pulsado, utilizando a linhagem celular de glioblastoma (U87MG) e o fármaco fotossensibilizador AlClPc encapsulado na nanopartícula de albumina.

4.8 - Microscopia Confocal

A microscopia confocal possibilita a formação de imagens em duas dimensões e em três dimensões de sistemas biológicos, além de poder ser utilizada para ensaios *in*

vivo em tempo real. A microscopia permite também determinar qualitativamente a localização e a quantidade do fármaco fotossensibilizador na célula, utilizando marcadores fluorescentes. Esta técnica permite a obtenção de imagens com ótima resolução e definição, pois todas as estruturas fora de foco são eliminadas (MUKERJEE e VISHWANATHA, 2009).

Os ensaios de microscopia confocal foram realizados com o propósito de comprovar a internalização dos fármacos fotossensibilizadores AlClPc e curcumina, bem como suas localizações na célula. Deste modo, através da análise da microscopia pode-se confirmar a internalização qualitativa da AlClPc e da curcumina, e como observa-se nas figuras abaixo, os fármacos fotossensibilizadores se localizam na região citoplasmática da célula de glioblastoma, após 24 horas de incubação. Pela análise da figura 35A, nota-se que a AlClPc, corada em vermelho, está localizada no nível citoplasmático. A curcumina (figura 35B), corada em amarelo, também está localizada no citoplasma da célula. A associação AlClPc-curcumina (figura 35C) mostrou que os fármacos fotossensibilizadores continuam na região citoplasmática, e observa-se também que ocorre maior internalização da curcumina na célula, do que quando a mesma não está associada com a AlClPc (figura XB). Deste modo, a incorporação dos fármacos fotossensibilizadores AlClPc e curcumina na região citoplasmática está de acordo com a característica de FS se acumular em organelas no citoplasma (BARBUGLI et al., 2010; BHAUMIK et al., 1999; DE PAULA et al., 2015a; LI et al., 2015; RODRIGUES et al., 2012) (LI et al., 2014).

Figura 35. Imagens da microscopia confocal da célula de glioblastoma humano (U87MG) incubada com os fármacos fotossensibilizadores AIClPc (A), curcumina (B), e a conjugação AIClPc-curcumina (C). A primeira coluna representa o núcleo celular corado com DAPI (azul) e o resultado da emissão de fluorescência do fármaco fotossensibilizador; a segunda coluna representa o citoesqueleto corado com faloidina (verde) e o resultado da emissão de fluorescência do fármaco fotossensibilizador; e a terceira coluna é o resultado da sobreposição do núcleo, citoesqueleto e fármaco fotossensibilizador. A AIClPc apresenta coloração vermelha, enquanto que a curcumina apresenta coloração amarela. Escala: 10 μ m.

5 - Conclusão

Com base nos resultados apresentados, foi possível concluir que as formulações de PAMQ, obtidas pelo *crosslinking* químico, podem ser reproduzidas com tamanho médio desejável (200 – 500nm), distribuição de tamanho homogêneo (IPd <0,5) e carga residual predominantemente negativa. As mesmas se mostraram estáveis ao longo de 9 meses, como foi comprovado pela estabilidade acelerada utilizando a centrífuga analítica LUMiSizer, pois nesse período a formulação não apresentou tendência a instabilidade físico-química, indicando que não houve formação de aglomerados, sedimentação, precipitação, ou separação de fases. Em relação a encapsulação de AlClPc e curcumina, a nanopartícula de albumina apresentou resultados desejáveis, já que a quantidade de fármaco incorporado é satisfatória para estudos *in vitro*. As formulações obtidas através do *crosslinking* térmico não apresentaram características desejáveis para estudos *in vitro*, pois a eficiência de encapsulação é baixa (em torno de 2%), e a nanopartícula mostra uma tendência a instabilidade físico-química após 60 dias. Deste modo, nanopartículas de albumina preparadas pelo *crosslinking* químico é um método promissor para ser utilizado como sistema de veiculação para o tratamento do câncer do sistema nervoso central, pois além de apresentarem características físico químicas desejáveis, a albumina é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica, possibilitando melhores resultados (ELZOGHBY , SAMY e ELGINDY, 2012; PERALTA et al., 2013).

Os ensaios *in vitro* de compatibilidade biológica das formulações em cultura celular de glioblastoma humano U87MG comprovaram que a nanopartícula de albumina não ocasionou efeito tóxico significativo para as células, na ausência de estímulo luminoso. Deste modo, foi escolhido as concentrações de 3 μM para AlClPc e 10 μM para curcumina para posteriormente realizar ensaios futuros de fototoxicidade *in vitro*, e avaliar o efeito do fármaco fotossensibilizador para aplicação na TFD para o tratamento de câncer do sistema nervoso central (BECHET et al., 2008; BRANNON-PEPPAS e BLANCHETTE, 2012).

Quando as células de glioblastoma sofreram irradiação de luz visível em uma dose máxima de 700 mJ cm^{-2} , o efeito fototóxico provocado pela PAMQAlClPc (3 μM) reduziu a viabilidade celular a 22%, enquanto que sob irradiação de luz visível em uma dose máxima de 2000 mJ cm^{-2} , o efeito fototóxico provocado pela PAMQCurcumina (10 μM) reduziu a viabilidade celular a 59%. Também foi irradiada a nanopartícula com

Conclusão

os fármacos associados, PAMQAlClPc+Curcumina, nas mesmas concentrações, com dose de energia de 500 mJ cm^{-2} para a AlClPc, e 2000 mJ cm^{-2} para a curcumina, provocando morte celular de 40%. Foram feitos ensaios em diferentes tempos de irradiação para potencializar o fotodano da célula de glioblastoma humano com a formulação PAMQAlClPc+Curcumina, e no intervalo de 6 horas, a morte celular foi de 77%, provocando deste modo, um efeito fototóxico desejável para o tratamento fotodinâmico.

A partir das imagens de microscopia confocal foi possível concluir a internalização qualitativa dos fármacos fotossensibilizadores, e observar que tanto a curcumina quanto a AlClPc se localizam na região citoplasmaática da célula de glioblastoma humano (DE PAULA et al., 2015a; LI et al., 2014).

Portanto, os resultados obtidos neste trabalho indicam que as nanopartículas protéicas apresentam grande potencial para veiculação de fármacos fotossensibilizadores para aplicação da TFD com o propósito do tratamento de câncer do sistema nervoso, incentivando estudos posteriores baseados em ensaios fotobiológicos *in vitro* e *in vivo*. A TFD é um método promissor não só para o tratamento de câncer do sistema nervoso, mas para o uso em outros tipos de câncer e patologias.

6- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXIS, F.; RHEE, J. W.; RICHIE, J. P.; RADOVIC-MORENO, A. F.; LANGER, R.; FAROKHZAD, O. C. New frontiers in nanotechnology for cancer treatment, *Urologic Oncology-Seminars and Original Investigations*, v. 26, p. 74-85, 2008.
- ALIFIERIS, C.; TRAFALIS, D. T. Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment, *Pharmacology & Therapeutics*, v. 152, p. 63-82, 2015.
- ALKILANY, A. M.; THOMPSON, L. B.; BOULOS, S. P.; SISCO, P. N.; MURPHY, C. J. Gold nanorods: Their potential for photothermal therapeutics and drug delivery, tempered by the complexity of their biological interactions, *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 64, p. 190-199, 2012.
- ALLEN, C. M.; SHARMAN, W. M.; VAN LIER, J. E. Current status of phthalocyanines in the photodynamic therapy of cancer, *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, v. 5, p. 161-169, 2001.
- ALLISON, R. R.; MOTA, H. C.; BAGNATO, V. S.; SIBATA, C. H. Bio-nanotechnology and photodynamic therapy - State of the art review, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 5, p. 19-28, 2008.
- ALLISON, R. R.; SIBATA, C. H. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 7, p. 61-75, 2010.
- ANDERSON, C.; HRABOVSKY, S.; MCKINLEY, Y.; TUBESING, K.; TANG, H. P.; DUNBAR, R.; MUKHTAR, H.; ELMETS, C. A. Phthalocyanine photodynamic therapy: Disparate effects of pharmacologic inhibitors on cutaneous photosensitivity and on tumor regression, *Photochemistry and Photobiology*, v. 65, p. 895-901, 1997.
- ANTON, N.; BENOIT, J. P.; SAULNIER, P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates - A review, *Journal of Controlled Release*, v. 128, p. 185-199, 2008.
- ASSUNCAO, E.; WILLIAMS, S. Comparison of continuous wave and pulsed wave laser welding effects , *Optics and Lasers in Engineering*, v. 51, p. 674-680, 2013.
- BAALOUSHA, M.; LEAD, J. R. Characterization of natural and manufactured nanoparticles by atomic force microscopy: Effect of analysis mode, environment and sample preparation, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 419, p. 238-247, 2013.
- BARBUGLI, P. A.; SIQUEIRA-MOURA, M. P.; ESPREAFICO, E. M.; TEDESCO, A. C. In Vitro Phototoxicity of Liposomes and Nanocapsules Containing Chloroaluminum Phthalocyanine on Human Melanoma Cell Line , *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 10, p. 569-573, 2010.

- BATTOGTOKH, G.; KANG, J. H.; KO, Y. T. Long-circulating self-assembled cholesteryl albumin nanoparticles enhance tumor accumulation of hydrophobic anticancer drug, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 96, p. 96-105, 2015.
- BECHET, D.; COULEAUD, P.; FROCHOT, C.; VIRIOT, M. L.; GUILLEMIN, F.; BARBERI-HEYOB, M. Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents, *Trends in Biotechnology*, v. 26, p. 612-621, 2008.
- BECHET, D.; MORDON, S. R.; GUILLEMIN, F.; BARBERI-HEYOB, M. A. Photodynamic therapy of malignant brain tumours: A complementary approach to conventional therapies, *Cancer Treatments Reviews*, v. 40, p. 229-241, 2014.
- BERETTA, J. R.; ROSSI, W.; NEVES, M. D. M.; ALMEIDA, I. A.; JUNIOR, N. D. V. Pulsed Nd:YAG laser welding of AISI 304 to AISI 420 stainless steels, *Optics and Lasers in Engineering*, v. 45, p. 960-966, 2007.
- BERLANDA, J.; KIESSLICH, T.; ENGELHARDT, V.; KRAMMER, B.; PLAETZER, K. Comparative in vitro study on the characteristics of different photosensitizers employed in PDT, *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, v. 100, p. 173-180, 2010.
- BERTRAND, N.; WU, J.; XU, X.; KAMALY, N.; FAROKHZAD, O. C. Cancer nanotechnology: The impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology, *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 66, p. 2-25, 2014.
- BHATTA, A. K.; KEYAL, U.; WANG, X. L. Photodynamic therapy for onychomycosis: A systematic review, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 15, p. 228-235, 2016.
- BHAUMIK, S.; ANJUM, R.; RANGARAJ, N.; PARDHASARADHI, B. V. V.; KHAR, A. Curcumin mediated apoptosis in AK-5 tumor cells involves the production of reactive oxygen intermediates, *FEBS Letters*, v. 456, p. 311-314, 1999.
- BISHT, K.; WAGNER, K. H.; BULMER, A. C. Curcumin, resveratrol and flavonoids as anti-inflammatory, cyto- and DNA-protective dietary compounds, *Toxicology*, v. 88-100, 2010.
- BRANNON-PEPPAS, L.; BLANCHETTE, J. O. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy, *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 64, p. 206-212, 2012.
- CALORI, I. R.; TEDESCO, A. C. Lipid vesicles loading aluminum phthalocyanine chloride: Formulation properties and disaggregation upon intracellular delivery, *Journal of Photochemistry & Photobiology*, v. 160, p. 240-247, 2016.
- CALVO, P.; VILAJATO, J. L.; ALONSO, M. J. Comparative in vitro evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules, and nanoemulsions, as ocular drug carriers, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 85, p. 530-536, 1996.
- CAMERIN, M.; MAGARAGGIA, M.; SONCIN, M.; JORI, G.; MORENO, M.; CHAMBRIER, I.; COOK, M. J.; RUSSELL, D. A. The in vivo efficacy of

- phthalocyanine-nanoparticle conjugates for the photodynamic therapy of amelanotic melanoma, *European Journal of Cancer*, v. 46, p. 1910-1918, 2010.
- CARUTHERS, S. D.; WICKLINE, S. A.; LANZA, G. M. Nanotechnological applications in medicine, *Current Opinion in Biotechnology*, v. 18, p. 26-30, 2007.
- CASTANO, A. P.; MROZ, P.; HAMBLIN, M. R. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity, *Nature Reviews Cancer*, v. 6, p. 535-545, 2006.
- CHENG, L.; WU, Q.; GURYANOVA, A.; HUANG, Z.; HUANG, Q.; RICH, J. N.; BAO, S. Elevated invasive potential of glioblastoma stem cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 406, p. 643-648, 2011.
- CHIU, H. T.; CHANG, C. Y.; PAN, H. W.; CHIANG, T. Y.; KUO, M. T.; WANG, Y. H. Characterization of polyurethane foam as heat seal coating in medical pouch packaging application, *Journal of Polymer Research*, v. 19, 2012.
- CLAESSENS, C. G.; HAHN, U.; TORRES, T. Phthalocyanines: From outstanding electronic properties to emerging applications, *Chemical Record*, v. 8, p. 75-97, 2008.
- CORADINI, K.; FRIEDRICH, R. B.; FONSECA, F. N.; VENCATO, M. S.; ANDRADE, D. F.; OLIVEIRA, C. M.; BATTISTEL, A. P.; GUTERRES, S. S.; DA ROCHA, M. I. U. MU.; POHLMANN, A. R.; BECK, R. C. R. A novel approach to arthritis treatment based on resveratrol and curcumin co-encapsulated in lipid-core nanocapsules: In vivo studies, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 78, p. 163-179, 2015.
- DABROWSKI, J. M.; PUCELIK, B.; REGIEL-FUTYRA, A.; BRINDELL, M.; MAZURYK, O.; KYZIOL, A.; STOCHEL, G.; MACYK, W.; ARNAUT, L. G. Engineering of relevant photodynamic processes through structural modifications of metallotetrapyrrolic photosensitizers, *Coordination Chemistry Reviews*, v. 325, p. 67-101, 2016.
- DAZIANO, J. P.; HUMEAU, L.; HENRY, M.; MANNONI, P.; CHANON, M.; CHABANNON, C.; JULLIARD, M. Preferential photoinactivation of leukemia cells by aluminum phthalocyanine, *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, v. 43, p. 128-135, 1998.
- DE PAULA, L. B.; PRIMO, F. L.; PINTO, M. R.; MORAIS, P. C.; TEDESCO, A. C. Combination of hyperthermia and photodynamic therapy on mesenchymal stem cell line treated with chloroaluminum phthalocyanine magnetic-nanoemulsion, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v. 380, p. 372-376, 2015a.
- DE PAULA, L. B.; TEDESCO, A. C.; PRIMO, F. L.; VILELA, J. M.; ANDRADE, M. S.; MOSQUEIRA, V. C. F. Chloroaluminium phthalocyanine polymeric nanoparticles as photosensitisers: Photophysical and physicochemical characterisation, release and phototoxicity in vitro, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 49, p. 371-381, 2015b.

- DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid Colorimetric Assay for Cell-Growth and Survival - Modifications to the Tetrazolium Dye Procedure Giving Improved Sensitivity and Reliability, *Journal of Immunological Methods*, v. 89, p. 271-277, 1986.
- DEROSA, G.; MAFFIOLI, P.; SIMENTAL-MENDÍA, L. E.; BO, S.; SAHEBKAR, A. Effect of curcumin on circulating interleukin-6 concentrations: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials, *Pharmacological Research*, v. 111, p. 394-404, 2016.
- DETLOFF, T.; SOBISCH, T.; LERCHE, D. Particle size distribution by space or time dependent extinction profiles obtained by analytical centrifugation (concentrated systems), *Powder Technology*, v. 174, p. 50-55, 2007.
- DETTY, M. R.; GIBSON, S. L.; WAGNER, S. J. Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy, *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 47, p. 3897-3915, 2004.
- DOLMANS, D. E. J. G. J.; FUKUMURA, D.; JAIN, R. K. Photodynamic therapy for cancer, *Nature Publishing Group*, v. 3, p. 380-387, 2003.
- DOUGHERTY, T. J. An Update on Photodynamic Therapy Applications, *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*, v. 20, p. 3-7, 2002.
- DOUGHERTY, T. J.; MARCUS, S. T. **Photodynamic Therapy**, *EurJ Cancer*, v. 28A, p. 1734-1742, 1992.
- DUVOIX, A.; BLASIUS, R.; DELHALLE, S.; SCHNEKENBURGER, M.; MORCEAU, F.; HENRY, E.; DICATO, M.; DIEDERICH, M. Chemopreventive and therapeutic effects of curcumin, *Cancer Letters*, v. 223, p. 181-190, 2005.
- EKAMBARAM, P.; SHATALI, A. A. H.; PRIYANKA, K. Solid Lipid Nanoparticles: A review, *Scientific Reviews & Chemical Communications*, v. 2, p. 80-102, 2011.
- ELHISSI, A. M. A.; AHMED, W.; HASSAN, I. U.; DHANAK, V. R.; D'EMANUELE, A. **Carbon Nanotubes in Cancer Therapy and Drug Delivery**, *Journal of Drug Delivery*, v. 2012, 2011.
- ELZOGHBY, A. O.; SAMY, W. M.; ELGINDY, N. A. Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems, *Journal of Controlled Release*, v. 157, p. 168-182, 2012.
- ESTEVEZ, J. P.; ASCENCIO, M.; COLIN, P.; FARINE, M. O.; COLLINET, P.; MORDON, S. Continuous or fractionated photodynamic therapy? Comparison of three PDT schemes for ovarian peritoneal micrometastasis treatment in a rat model, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 7, p. 251-257, 2010.
- FANALI, G.; DI MASI, A.; TREZZA, V.; MARINO, M.; FASANO, M.; ASCENZI, P. Human serum albumin: From bench to bedside, *Molecular Aspects of Medicine*, v. 33, p. 209-290, 2012.
- FARIA, P. E. P.; FELIPUCCI, D. N. B.; SIMIONI, A. R.; PRIMO, F. L.; TEDESCO, A. C.; SALATA, L. A. Effects of Photodynamic Process (PDP) in Implant

- Osseointegration: A Histologic and Histometric Study in Dogs, *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, v. 17, p. 879-890, 2015.
- FAROKHZAD, O. C.; LANGER, R. Impact of Nanotechnology on Drug Delivery, *Acs Nano*, v. 3, p. 16-20, 2009.
- FIEDLER, D. M.; SCHNITZHOFFER, G.; WALT, H.; DOBLER-GIRDZIUNAITE, D.; KRAMMER, B. Photodynamic Cytotoxicity Enhancement by Pulsed Diode Laser Irradiation, *Lasermedicine*, v. 15, p. 107-114, 2000.
- FILBIN, M. G.; STILES, C. D. Of Brains and Blood: Developmental Origins of Glioma Diversity?, *Cancer Cell*, v. 28, p. 403-404, 2015.
- FRANCHI, L. P.; AMANTINO, C. F.; MELO, M. T.; MONTALDI, A. P. L.; PRIMO, F. L.; TEDESCO, A. C. In vitro effects of photodynamic therapy induced by chloroaluminum phthalocyanine nanoemulsion, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 2016.
- GAO, L. D.; QIAN, X. H.; ZHANG, L.; ZHANG, Y. X. Tetra-trifluoroethoxyl zinc phthalocyanine: potential photosensitizer for use in the photodynamic therapy of cancer, *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, v. 65, p. 35-38, 2001.
- GIGO-BENATO, D.; GEUNA, S.; ROCHKIND, S. Phototherapy for enhancing peripheral nerve repair: A review of the literature, *Muscle & Nerve*, v. 31, p. 694-701, 2005.
- GOTO, P. L.; VILELA, J. M. C.; ANDRADE, M. S.; DOS SANTOS, O. D. H. Preparation and Characterization of Polymeric Nanocapsules Produced by in Situ Polymerization From Nanoemulsions Produced by Direct Emulsification , *Journal of Dispersion Science and Technology*, v. 34, p. 228-233, 2013.
- GUINEBRETIERE, S.; BRIANCON, S.; FESSI, H.; TEODORESCU, V. S.; BLANCHIN, M. G. Nanocapsules of biodegradable polymers: preparation and characterization by direct high resolution electron microscopy, *Materials Science & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems*, v. 21, p. 137-142, 2002.
- HARIHARAN, R.; SENTHILKUMAR, S.; SUGANTHI, A.; RAJARAJAN, M. Photodynamic action of curcumin derived polymer modified ZnO nanocomposites, *Materials Research Bulletin*, v. 47, p. 3090-3099, 2012.
- HARPER, J. D.; LIEBER, C. M.; LANSBURY, P. T. Atomic force microscopic imaging of seeded fibril formation and fibril branching by the Alzheimer's disease amyloid-p protein, *Chemistry & Biology*, v. 4, p. 951-959, 1997.
- HARTWELL, L. H.; KASTAN, M. B. Cell Cycle Control and Cancer, *Science*, v. 266, 1994.
- HATCHER, H.; PLANALP, R.; CHO, J.; TORTIA, F. M.; TORTI, S. V. Curcumin: From ancient medicine to current clinical trials, *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 65, p. 1631-1652, 2008.

- HEINRICH, T. A.; TEDESCO, A. C.; FUKUTO, J. M.; DA SILVA, R. S. Production of reactive oxygen and nitrogen species by light irradiation of a nitrosyl phthalocyanineruthenium complex as a strategy for cancer treatment, *Royal Society of Chemistry*, v. 43, p. 4021-4025, 2013.
- HOEBEKE, M. The importance of liposomes as models and tools in the understanding of photosensitization mechanisms, *Journal of Photochemistry & Photobiology*, v. 28, p. 189-196, 1995.
- HOLLAND, E. C. Glioblastoma multiforme: The terminator, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 97, p. 6242-6244, 2000.
- <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home> (acessado em 20/09/2016)
- ITO, A.; SHINKAI, M.; HONDA, H.; KOBAYASHI, T. Medical application of functionalized magnetic nanoparticles, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 100, p. 1-11, 2005.
- ITRI, R.; JUNQUEIRA, H. C.; MERTINS, O.; BAPTISTA, M. S. Membrane changes under oxidative stress: the impact of oxidized lipids, *Biophys Rev*, v. 6, p. 47-61, 2014.
- JAIN, K. K. Nanotechnology in clinical laboratory diagnostics, *Clinica Chimica Acta*, v. 358, p. 37-54, 2005.
- JAYME, C. C.; CALORI, I. R.; TEDESCO, A. C. Spectroscopic analysis of aluminum chloride phthalocyanine in binary water/ethanol systems for the design of a new drug delivery system for photodynamic therapy cancer treatment, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 153, p. 178-183, 2016.
- KAWAUCHI, S.; MORIMOTO, Y.; SATO, S.; ARAI, T.; SEGUCHI, K.; ASANUMA, H.; KIKUCHI, M. Differences between cytotoxicity in photodynamic therapy using a pulsed laser and a continuous wave laser: study of oxygen consumption and photobleaching, *Lasers in Medical Science*, v. 18, p. 179-183, 2004.
- KINGSLEY, J. D.; DOU, H. Y.; MOREHEAD, J.; RABINOW, B.; GENDELMAN, H. E.; DESTACHE, C. J. Nanotechnology: A Focus on Nanoparticles as a Drug Delivery System, *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, v. 1, p. 340-350, 2006.
- KONAN, Y. N.; GURNY, R.; ALLEMANN, E. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy, *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, v. 66, p. 89-106, 2002.
- KOON, H. K.; LEUNG, A. W. N.; YUE, K. K. M.; MAK, N. K. Photodynamic effect of curcumin on NPC/CNE2 cell, *Journal of Environmental Pathology Toxicology and Oncology*, v. 25, p. 205-215, 2006.
- KUDINOVA, N. V.; BEREZOV, T. T. Photodynamic Therapy of Cancer: Search For Ideal Photosensitizer, *Biomeditsinskaya Khimiya*, v. 4, p. 95-103, 2008.

- KUFLEITNER, J.; WAGNER, S.; WOREK, F.; VON BRIESEN, H.; KREUTER, J. Adsorption of obidoxime onto human serum albumin nanoparticles: Drug loading, particle size and drug release, *Journal of Microencapsulation*, v. 27, p. 506-513, 2010.
- LANGER, K.; ANHORN, M. G.; STEINHAUSER, I.; DREIS, S.; CELEBI, D.; SCHRICKEL, I.; FAUST, S.; VOGEL, V. Human serum albumin (HSA) nanoparticles: Reproducibility of preparation process and kinetics of enzymatic degradation, *International Journal of Pharmaceutics*, v. 347, p. 109-117, 2008.
- LANGER, K.; BALTHASAR, S.; VOGEL, V.; DINAUER, N.; VON BRIESEN, H.; SCHUBERT, D. Optimization of the preparation process for human serum albumin (HSA) nanoparticles, *International Journal of Pharmaceutics*, v. 257, p. 169-180, 2003.
- LEE, M.; YOO, D.; LING, D.; CHO, M. H.; HYEON, T.; CHEON, J. Iron Oxide Based Nanoparticles for Multimodal Imaging and Magnetoresponsive Therapy, *Chemical Reviews* 2015.
- LEE, S. Y. Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme, *Genes & Diseases*, v. 3, p. 198-210, 2016.
- LERCHE, D.; SOBISCH, T. Evaluation of particle interactions by in situ visualization of separation behaviour, *Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 440, p. 122-130, 2014.
- LI, D. H.; LI, L.; LI, P. X.; LI, Y.; CHEN, X. Y. Apoptosis of HeLa cells induced by a new targeting photosensitizer-based PDT via a mitochondrial pathway and ER stress, *Oncotargets and Therapy*, v. 8, p. 703-711, 2015.
- LI, L.; XIANG, D.; SHIGDAR, S.; YANG, W.; LI, Q.; JIA, L.; LIU, K.; DUAN, W. Epithelial cell adhesion molecule aptamer functionalized PLGA-lecithin-curcumin-PEG nanoparticles for targeted drug delivery to human colorectal adenocarcinoma cells, *International Journal of Nanomedicine*, v. 9, p. 1083-1096, 2014.
- LIU, T. Y.; HU, S. H.; LIU, D. M.; CHEN, S. Y.; CHEN, I. W. Biomedical nanoparticle carriers with combined thermal and magnetic responses, *Nano Today*, v. 4, p. 52-65, 2009.
- LONGO, J. P. F.; LEAL, S. C.; SIMIONI, A. R.; ALMEIDA-SANTOS, M. F. M.; TEDESCO, A. C.; AZEVEDO, R. B. Photodynamic therapy disinfection of carious tissue mediated by aluminum-chloride-phthalocyanine entrapped in cationic liposomes: an in vitro and clinical study, *Lasers Med Sci*, v. 27, p. 575-584, 2012.
- LOPES, T. G.; CASTILHO-FERNANDES, A.; TEDESCO, A. C. Ampla caracterização do Glioblastoma e abordagens terapêuticas, *Revista da Universidade Vale do Rio Verde*, v. 10, p. 12-25, 2012.

- LOPEZ-LOURENTE, A. I.; VALCARCEL, M. The third way in analytical nanoscience and nanotechnology: Involvement of nanotools and nanoanalytes in the same analytical process, *Trends in Analytical Chemistry*, v. 75, p. 1-9, 2016.
- LUNARDI, C. N.; TEDESCO, A. C. Synergic photosensitizers: A new trend in photodynamic therapy, *Current Organic Chemistry*, v. 9, p. 813-821, 2005.
- MAEDA, H. The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor selective macromolecular drug targeting., *Advances in Biological Regulation*, p. 207, 2001.
- MAHER, E. A.; FURNARI, F. B.; BACHOO, R. M.; ROWITCH, D. H.; LOUIS, D. M.; CAVENEE, W. K.; DEPINHO, R. A. Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter, *Genes & Development*, v. 15, p. 1311-1333, 2001.
- MAHESHWARI, R. K.; SINGH, A. K.; GADDIPATI, J.; SRIMAL, R. C. Multiple biological activities of curcumin: A short review, *Life Sciences*, v. 78, p. 2081-2087, 2005.
- MARANHO, D. S.; DE LIMA, R. G.; PRIMO, F. L.; DA SILVA, R. S.; TEDESCO, A. C. Photoinduced Nitric Oxide and Singlet Oxygen Release from ZnPC Liposome Vehicle Associated with the Nitrosyl Ruthenium Complex: Synergistic Effects in Photodynamic Therapy Application, *Photochemistry and Photobiology*, v. 85, p. 705-713, 2009.
- MARTY, J. J.; OPPENHEIMER, R. C.; SPEISER, P. Nanoparticles - a new colloidal drug delivery system., *Pharmaceutica Acta Helvetia*, v. 53, p. 23, 1978.
- MEI, L.; ZHANG, Z.; ZHAO, L.; HUANG, L.; YANG, X. L.; TANG, J.; FENG, S. S. Pharmaceutical nanotechnology for oral delivery of anticancer drugs, *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 65, p. 880-890, 2013.
- MEIR, E. G. V.; HADJIPANAYIS, C. G.; NORDEN, A. D.; SHU, H. K.; WEN, P. Y.; OLSON, J. J. Exciting New Advances in Neuro-Oncology: The Avenue to a Cure for Malignant Glioma, *American Cancer Society*, v. 60, p. 166-193, 2010.
- MICHELS, S. Sequence of early vascular events after photodynamic therapy, *Investigation Ophthalmology Science*, v. 44, p. 2147-2154, 2003.
- MIQUEL, J.; BERND, A.; SEMPERE, J. M.; DIAZ-ALPERI, J.; RAMIREZ, A. The curcuma antioxidants: pharmacological effects and prospects for future clinical use: A review, *Archives of Gerontology and Geriatrics*, v. 34, p. 37-46, 2002.
- MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery, *International Journal of Pharmaceutics*, v. 385, p. 113-142, 2009.
- MORAIS, M.; VASCONCELOS, R. C.; LONGO, J. P. F.; MUEHLMANN, L. A.; AZEVEDO, R. B.; LEMOS, T. M. A. M.; COSTA, A. L. L. Effects of photodynamic therapy mediated by nanoemulsion containing chloro-aluminum phthalocyanine: a histologic and immunohistochemical study in human gingiva, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 12, p. 592-597, 2015.

- MUKERJEE, A.; VISHWANATHA, J. K. **Formulation, Characterization and Evaluation of Curcumin-loaded PLGA Nanospheres for Cancer Therapy**, *Anticancer Research*, v. 29, p. 3867-3876, 2009.
- NAVAEIPOUR, F.; AFSHARAN, H.; TAJALLI, H.; MOLLABSHI, M.; RANJBARI, F.; MONTASERI, A.; RAHIDI, M. R. Effects of continuous wave and fractionated diode laser on human fibroblast cancer and dermal normal cells by zinc phthalocyanine in photodynamic therapy: A comparative study, *Journal of Photochemistry & Photobiology*, v. 161, p. 456-462, 2016.
- NUNES, S. M. T.; SGUILLA, F. S.; TEDESCO, A. C. **Photophysical studies of zinc phthalocyanine and chloroaluminum phthalocyanine incorporated into liposomes in the presence of additives**, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 37, p. 273-284, 2004.
- NYMAN, E.; HYNINEN, P. Research advances in the use of metatrapyrrolic photodynamic therapy, *Journal of Photochemistry & Photobiology*, v. 73, p. 1-28, 2004.
- OGURA, S.; TABATA, K.; FUKUSHIMA, K.; KAMACHI, T.; OKURA, I. Development of phthalocyanines for photodynamic therapy, *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, v. 10, p. 1116-1124, 2006.
- ONISZCZUKA, A.; WOJTUNIK-KULESZAK, K. A.; ONISZCZUK, T.; KASPRZAKA, K. The potential of photodynamic therapy (PDT)—Experimental investigations and clinical use, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 83, p. 919-929, 2016.
- PASCHOAL, M. A.; TONON, C. C.; SPOLIDORIO, D. M. P.; BAGNATO, V. S.; GIUSTI, J. S. M.; PINTO, L. S. **Photodynamic potential of curcumin and blue LED against *Streptococcus mutans* in planktonic culture**, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 10, p. 313-319, 2013.
- PATEL, T.; ZHOU, J. B.; PIEPMEIER, J. M.; SALTZMAN, W. M. Polymeric nanoparticles for drug delivery to the central nervous system, *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 64, p. 701-705, 2012.
- PERALTA, D. V.; HE, J.; WHEELER, D. A.; ZHANG, J. Z.; TARR, M. A. Encapsulating Gold Nanomaterials Into Size-Controlled Human Serum Albumin Microparticles for Photothermal Cancer Therapy Platforms, *Langmuir*, p. 1-19, 2013.
- PEREIRA, M. A.; MOSIQUEIRA, V. C.; VILELA, J. M. C.; ANDRADE, M. S.; RAMALDES, G. A.; CARDOSO, V. N. PLA-PEG nanocapsules radiolabeled with (99m)Technetium-HMPAO: Release properties and physicochemical characterization by atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 33, p. 42-51, 2008.
- PETZOLD, G.; GOLTZCHE, C.; MENDE, M.; SCHWARTZ, S.; JAEGER, W. Monitoring the Stability of Nanosized Silica Dispersions in Presence of

- Polycations by a Novel Centrifugal Sedimentation Method , *Journal of Applied Polymer Science*, v. 114, p. 696-704, 2009.
- PREETZ, C.; HAUSE, G.; KRAMER, A.; MADER, K. Application of atomic force microscopy and ultrasonic resonator technology on nanoscale: Distinction of nanoemulsions from nanocapsules , *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 39, p. 141-151, 2010.
- PRIMO, F. L.; MACAROFF, P. P.; LACAVA, Z. G. M.; AZEVEDO, R. B.; MORAIS, P. C.; TEDESCO, A. C. Binding and photophysical studies of biocompatible magnetic fluid in biological medium and development of magnetic nanoemulsion: A new candidate for cancer treatment, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v. 310, p. 2838-2840, 2007.
- PRIYADARSINI, K. I. Photophysics, photochemistry and photobiology of curcumin: Studies from organic solutions, bio-mimetics and living cells, *Journal of Photochemistry and Photobiology C-Photochemistry Reviews*, v. 10, p. 81-95, 2009.
- RIBEIRO, A. P. D.; ANDRADE, M. C.; BAGNATO, V. S.; VERGANI, C. E.; PRIMO, F. L.; TEDESCO, A. C.; PAVARINA, A. C. Antimicrobial photodynamic therapy against pathogenic bacterial suspensions and biofilms using chloro-aluminum phthalocyanine encapsulated in nanoemulsions, *Lasers Med Sci*, v. 30, p. 549-559, 2015.
- RODRIGUES, G. B.; PRIMO, F. L.; TEDESCO, A. C.; BRAGA, G. U. L. In Vitro Photodynamic Inactivation of *Cryptococcus neoformans* Melanized Cells with Chloroaluminum Phthalocyanine Nanoemulsion, *Photochemistry and Photobiology*, v. 88, p. 440-447, 2012.
- ROLAND, I.; PIEL, G.; DELATTRE, L.; EVRARD, B. Systematic characterization of oil-in-water emulsions for formulation design, *International Journal of Pharmaceutics*, v. 263, p. 85-94, 2003a.
- ROLAND, I.; PIEL, G.; DELATTRE, L.; EVRARD, B. Systematic characterization of oil-in-water emulsions for formulation design, *International Journal of Pharmaceutics*, v. 263, p. 85-94, 2003b.
- RUBY, A. J.; KUTTAN, G.; BABU, K. D.; RAJASEKHARAM, K. N.; KUTTAN, R. Anti-tumour and antioxidant activity of natural curcuminoids, *Cancer Letters*, v. 94, p. 79-83, 1995.
- RUI, L. L.; CAO, H. L.; XUE, Y. D.; LIU, C. H.; XU, L.; GAO, Y.; ZHANG, W. A. Functional organic nanoparticles for photodynamic therapy, *Chinese Chemical Letters* 2016.
- SAHOO, S. K.; DIINAWAZ, F.; KRISHNAKUMAR, S. Nanotechnology in ocular drug delivery, *Drug Discovery Today*, v. 13, p. 144-151, 2008.
- SAKAMOTO, K.; KATO, T.; OKUMURA, E. O.; WATANABE, M.; COOK, M. O. Synthesis of novel cationic amphiphilic phthalocyanine derivatives for next

- generation photosensitizer using photodynamic therapy of cancer, *Dyes and Pigments*, v. 64, p. 63-71, 2004.
- SARKAR, T.; HUSSAIN, A. Photocytotoxicity of Curcumin and its Iron Complex, *Enzyme Engineering*, v. 5, 2016.
- SEBAK, S.; MIRZAEI, M.; MALHOTRA, M.; KULAMARVA, A.; PRAKASH, S. Human serum albumin nanoparticles as an efficient noscapine drug delivery system for potential use in breast cancer: preparation and in vitro analysis, *International Journal of Nanomedicine*, v. 5, p. 525-532, 2010.
- SELVAM, R.; SUBRAMANIAN, L.; GAYATHRI, R.; ANGAYARKANNI, N. The anti-oxidant activity of turmeric (*Curcuma longa*), *Journal of Ethnopharmacology*, v. 47, p. 59-67, 1995.
- SENGE, M. O. mTHPC — A drug on its way from second to third generation photosensitizer?, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 9, p. 170-179, 2012.
- SESALAN, B. S.; KOCA, A.; GUL, A. Water soluble novel phthalocyanines containing dodeca-amino groups, *Dyes and Pigments*, v. 79, p. 259-264, 2008.
- SHARMAN, W. M.; ALLEN, C. M.; VAN LIER, J. E. Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications, *Drug Discovery Today*, v. 4, p. 507-517, 1999.
- SHEN, L.; JI, H. F.; ZHANG, H. Y. A TD-DFT study on triplet excited-state properties of curcumin and its implications in elucidating the photo sensitizing mechanisms of the pigment, *Chemical Physics Letters*, v. 409, p. 300-303, 2005.
- SHI, J. J.; VOTRUBA, A. R.; FAROKHZAD, O. C.; LANGER, R. Nanotechnology in Drug Delivery and Tissue Engineering: From Discovery to Applications, *Nano Letters*, v. 10, p. 3223-3230, 2010.
- <http://www.sigmaaldrich.com/canada-english.html> (acessado 20/09/2016)
- SIQUEIRA-MOURA, M. P.; PRIMO, F. L.; ESPREAFICO, E. M.; TEDESCO, A. C. Development, characterization, and photocytotoxicity assessment on human melanoma of chloroaluminum phthalocyanine nanocapsules, *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, v. 33, p. 1744-1752, 2013.
- SIQUEIRA-MOURA, M. P.; PRIMO, F. L.; PETI, A. P. F.; TEDESCO, A. C. Validated spectrophotometric and spectrofluorimetric methods for determination of chloroaluminum phthalocyanine in nanocarriers, *Pharmazie*, v. 65, p. 9-14, 2010.
- SOBISCH, T.; LERCHE, D. Thickener performance traced by multisample analytical centrifugation, *Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 331, p. 114-118, 2008.

- SPAGNUL, C.; TURNER, L. C.; BOYLE, R. W. Immobilized photosensitizers for antimicrobial applications, *Journal of Photobiology & Biology*, v. 150, p. 11-30, 2015.
- STYLLI, S. S.; HILL, J. S.; SAWYER, W. H.; KAYE, A. H. Aluminum Phthalocyanine Mediated Photodynamic Therapy in Experimental Malignant Glioma, *Journal of Clinical Neuroscience*, v. 2, p. 146-151, 1995.
- TABATA, Y.; IKADA, Y. Macrophage phagocytosis of biodegradable microspheres composed of L-lactic acid/glycolic acid homo and copolymers, *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 22, p. 837-858, 1988.
- TARDIVO, J. P.; GIGLIO, A. D.; OLIVEIRSA, C. S.; GABRIELLI, D. S.; JUNQUEIRA, H. C.; TADA, D. B.; SEVERINO, D.; TURCHIELLO, R. F.; BAPTISTA, M. S. Methylene blue in photodynamic therapy: from basic mechanisms to clinical application, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 2, p. 175-191, 2005.
- TEDESCO, A. C.; PRIMO, F. L.; BELTRAME, M. Phthalocyanines: Synthesis, Characterization and Biological Applications of Photodynamic Therapy (PDT), Nanobiotechnology, Magnetohyperthermia and Photodiagnosis (Theranostics), *Materials Science and Materials Engineering* p. 1-6, 2016.
- TEDESCO, A. C.; ROTTA, J. C. G.; LUNARDI, C. N. Synthesis, photophysical and photochemical aspects of phthalocyanines for photodynamic therapy, *Current Organic Chemistry*, v. 7, p. 187-196, 2003.
- TEIXEIRA, M.; ALONSO, M. J.; PINTO, M. M. M.; BARBOSA, C. M. Development and characterization of PLGA nanospheres and nanocapsules containing xanthone and 3-methoxyxanthone, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 59, p. 491-500, 2005.
- TELLINGEN, O.; YETKIN-ARIK, B.; GOOIJER, M. C.; WESSELING, P.; WURDINGER, T.; VRIES, H. E. Overcoming the blood-brain tumor barrier for effective glioblastoma treatment, *Drug Resistance Updates*, v. 19, p. 1-12, 2015.
- TRAN, B.; ROSENTHAL, M. A. Survival comparison between glioblastoma multiforme and other incurable cancers, *Journal of Clinical Neuroscience*, v. 17, p. 417-421, 2010.
- TWENTYMAN, P. R.; LUSCOMBE, M. A Study of Some Variables in A Tetrazolium Dye (Mtt) Based Assay for Cell-Growth and Chemosensitivity, *British Journal of Cancer*, v. 56, p. 279-285, 1987.
- WEBER, C.; COESTER, C.; KREUTER, J.; LANGER, K. Desolvation process and surface characterisation of protein nanoparticles, *International Journal of Pharmaceutics*, v. 194, p. 91-102, 2000.
- WIKENE, K. O.; HEGGE, A. B.; BRUZELL, E.; TONNESEN, H. H. Formulation and characterization of lyophilized curcumin solid dispersions for antimicrobial photodynamic therapy (aPDT): studies on Wikencurcumin and curcuminoids LII, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 6, p. 969-977, 2014.

<http://www.who.int/eportuguese/countries/bra/pt/> (Acessado 16/09/2016)

XIAO, Z.; HALLS, S.; DICKEY, D.; TULIP, J.; MOORE, R. B. Fractionated versus Standard Continuous Light Delivery in Interstitial Photodynamic Therapy of Dunning Prostate Carcinomas, *Cancer Therapy: Preclinical*, v. 24, p. 7496-7505, 2007.

XU, R. L. Progress in nanoparticles characterization: Sizing and zeta potential measurement, *Particuology*, v. 6, p. 112-115, 2008.

YANA, S.; ZHANG, H.; PIAO, J.; CHEN, Y.; GAO, S.; LU, C.; NIU, L.; XIAO, Y.; HUA, Y.; JIA, R.; WANG, H.; XU, X. Studies on the preparation, characterization and intracellular kinetics of JD27-loaded human serum albumin nanoparticles, *Procedia Engineering*, v. 102, p. 590-601, 2015.

YEDOMON, B.; FESSI, H.; CHARCOSSET, C. Preparation of Bovine Serum Albumin (BSA) nanoparticles by desolvation using a membrane contactor: A new tool for large scale production, *European Journal of Pharmaceutical and Biopharmaceutics*, v. 85, p. 398-405, 2013.

YIH, T. C.; AL-FANDI, M. Engineered nanoparticles as precise drug delivery systems, *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 97, p. 1184-1190, 2006.

YOU, J. S.; JONES, P. A. Cancer Genetics and Epigenetics: Two Sides of the Same Coin?, *Cancer Cell*, v. 22, p. 9-20, 2013.

YU, M.; WU, J.; SHI, J.; FAROKHZAD, O. C. Nanotechnology for protein delivery: Overview and perspectives, *Journal of Controlled Release* 2015.

ZANOTTO-FILHO, A.; CORADINI, K.; BRAGANHOL, E.; SCHRODER, R.; DE OLIVEIRA, C. M.; SIMÕES-PIRES, A.; BATTASTINI, A. M. O.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; FORCELINI, C. M.; BECK, R. C. R.; MOREIRA, J. C. F. Curcumin-loaded lipid-core nanocapsules as a strategy to improve pharmacological efficacy of curcumin in glioma treatment, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 83, p. 156-167, 2013.

ZHANG, L. J.; WEBSTER, T. J. Nanotechnology and nanomaterials: Promises for improved tissue regeneration, *Nano Today*, v. 4, p. 66-80, 2009.

ZHANG, L. J.; ZHANG X, H.; LIAO, P. Y.; SUN, J. J.; WANG, L.; YAN, Y. J.; CHEN, Z. L. Antitumor activity evaluation of meso-tetra (pyrrolidine substituted) pentylporphyrin-mediated photodynamic therapy in vitro and in vivo, *Journal of Photochemistry and Photobiology*, v. 163, p. 223-231, 2016.

ZORZI, G. K.; CARVALHO, E. L. S.; VON POSER, G. L.; TEIXEIRA, H. F. On the use of nanotechnology-based strategies for association of complex matrices from plant extracts, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 25, p. 426-436, 2015.